

**KAURAN (*AVENA SATIVA*) PUNAHOMEINFEKTION KUVANTAMINEN RGB- JA
FLUORESENSSIKAMEROIN KANSALLISESSA KASVIEN
FENOTYYPPAUSINFRASTRUKTUURISSA**

Lauri Lehtilä
Maisterintutkielma
Maataloustieteet
Kasvintuotantotieteet
Helsingin yliopisto
Maataloustieteiden osasto
Tammikuu 2019

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Osasto — Sektion — Department Maataloustieteiden osasto	
Tekijä — Författare — Author Lauri Lehtilä			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Kauran (<i>Avena sativa</i>) punahomeinfektion kuvantaminen RGB- ja fluoresenssikameroin kansallisessa kasvien fenotyypausinfrastruktuurissa			
Oppiaine — Läroämne — Subject Kasvintuotantotieteet			
Työn laji — Arbetets art — Level Maisterintutkielma	Aika — Datum — Month and year Tammikuu 2019	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 77 s.	
<p>Tiivistelmä — Referat — Abstract</p> <p>Kaura on merkittävä viljelykasvi maailman suurimpien kauran viejämaiden joukkoon lukeutuvassa Suomessa. Kaurasta kehitetyt lisäarvotuotteet ovat kasvattaneet suosiotaan sekä terveellisinä kotimaisina elintarvikkeina että arvokkaina vientituotteina. Kauran viljelyn haasteena ovat <i>Fusarium</i>-suvun taudinaiheuttajien aiheuttamat punahomeet ja punahometartunnan seurauksena kaurasatoon kertyvät mykotoksiinit. Punahometartuntojen on ennustettu yleistyvän tulevaisuudessa ilmastomuutoksen myötä, mikä lisää tarvetta taudinkestävien kauralajikkeiden jalostamiselle. Kasvinjalostus tarvitsee entistä tehokkaampia ja luotettavampia menetelmiä haasteeseen vastaamiseksi ja yhtenä mahdollisuutena voidaan pitää automaattisia kuvantamiseen perustuvia fenotyypausmenetelmiä. Tämän maisterintutkielman tavoitteena oli osana Helsingin yliopiston ja Luonnonvarakeskuksen FusNaPPI-hanketta kehittää menetelmät kauran ja kauran punahomeilla tartutettujen tähkylöiden fenotyypaukseen hyödyntäen Helsingin yliopiston Viikin kasvihuoneilla käytössä olevaa kansallista kasvien fenotyypausinfrastruktuuria RGB- ja fluoresenssikameroin.</p> <p>Kehitetyillä menetelmillä pyrittiin erottamaan punahomeelle vastustuskykyisiä kauralajikkeita ja seuraamaan kasvien kasvua ja morfologiaa sekä punahometartunnan etenemistä. Tavoitteiden saavuttamiseksi kasvatettiin seitsemää taudinkestävyydeltään erilaista kauragenotyyppiä, joita kuvattiin niiden kasvun ja kehityksen aikana automaattisesti RGB-kameroin. Kasveista irrotettiin röyhyn kukintavaiheen aikana tähkylöitä erilaisille <i>in vitro</i> –kasvatusalustoille ja tähkylöitä tartutettiin <i>F. graminearum</i> –sienen kuromaitiöitä sisältävällä tartukkeella pistetartutuksena tähkylän sisään. Punahometartunnan etenemistä seurattiin fluoresenssikameroin tähkylöiden fotosynteesissä tapahtuvien muutosten havaitsemiseksi eri genotyypeissä ja kasvatusalustoilla.</p> <p>Punahometartunnan etenemisen vaiheet nähtiin fluoresenssiaineistosta ja tartunnan seurauksena tähkylän fotosynteesin havaittiin heikkenevän nopeammin alttiissa kuin kestävisissä genotyypeissä. RGB-aineistosta erotettiin eri kasvuvaiheissa morfologisilta ominaisuuksiltaan toisistaan poikkeavia genotyyppisiä.</p> <p>Kokeissa onnistuttiin seuraamaan punahomeinfektion etenemistä ja vahvistamaan kauragenotyyppien ennalta tunnettua taudinkestävyyttä tartunnan etenemisnopeuden perusteella. Automaattisen fenotyypauksen menetelmiä kasvinjalostuksen työkaluina kehitettiin ja menetelmien soveltuvuutta kauran punahomeresistenssin arviointiin voitiin onnistuneesti testata.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords Kaura, punahome, mykotoksiinit, fenotyypaus, RGB-kuvaus, fluoresenssikuvaus, kasvitautiresistenssi			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Maataloustieteiden maisteriohjelma, maataloustieteiden osasto ja Viikin kampuskirjasto			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Työtä ohjasivat tutkija Juho Hautsalo (Luke), dosentti Kristiina Himanen (HY), tutkija Mirko Pavicic (HY) ja professori Jari Valkonen (HY)			

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Osasto — Sektion — Department Department of Agricultural Sciences
Tekijä — Författare — Author Lauri Lehtilä		
Työn nimi — Arbetets titel — Title Imaging of head blight infection of oats (<i>Avena sativa</i>) using RGB- and chlorophyll fluorescence imaging sensors in the national plant phenotyping infrastructure		
Oppiaine — Läroämne — Subject Plant production sciences		
Työn laji — Arbetets art — Level M.Sc. Thesis	Aika — Datum — Month and year January 2019	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 77 p.
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>Oats is a major crop in Finland, in one of the most remarkable exporter countries of oats. Oat based value-added products have increased their favor both as healthy domestic foodstuff and as valuable export products. <i>Fusarium</i> head blight infections and mycotoxins accumulated to the oat crops because of the head blight infection pose a serious challenge to the oat production. The head blight infections are predicted to become more common in the future due to the climate change, which increases the need for breeding of new resistant cultivars against the head blight infection. Plant breeding needs more effective and reliable methods to face the challenge. Automatic imaging based high-throughput phenotyping methods can be considered as one possibility to intensify plant breeding. Aim of this master's thesis was to develop methods for phenotyping oats and head blight infected oat spikelets using RGB- and chlorophyll fluorescence imaging sensors of national plant phenotyping infrastructure in Viikki greenhouses of University of Helsinki. Thesis was carried out as a part of FusNaPPI-project of University of Helsinki and Natural Resources Institute Finland (Luke).</p> <p>Resistant oat genotypes against head blight infection were distinguished, growth and morphology of the oats and progression of the head blight infection were monitored by the developed methods. To reach the goals seven oat genotypes different in head blight resistance were grown and imaged using RGB-sensors during their growth and development. Spikelets were collected from the plants in their flowering phase and were put onto the different <i>in vitro</i> –assays. Spikelets were then inoculated putting the inoculum based on conidia of the <i>F. graminearum</i> inside the spikelets and imaged using chlorophyll fluorescence imaging sensors to detect changes in their photosynthesis in different genotypes and <i>in vitro</i> –assays.</p> <p>Different stages of the head blight infection were seen from the fluorescence data. Decreasing of photosynthetic activity of the spikelet tissues was faster in susceptible genotypes than in resistant ones. Oat genotypes that were different in their morphology in different developmental stages were distinguished in the RGB data.</p> <p>In the experiments, progression of the head blight infection was successfully monitored and the known differences in the disease resistance between oat genotypes were confirmed on the basis of the disease propagation speed. Methods of automatic high-throughput phenotyping as a tools for plant breeding were developed and suitability of these methods for plant's disease resistance screening were successfully tested.</p>		
Avainsanat — Nyckelord — Keywords Oats, <i>Fusarium</i> head blight, mycotoxins, phenotyping, RGB-imaging, chlorophyll fluorescence imaging, disease resistance		
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Master's Programme in Agricultural Sciences, Department of Agricultural Sciences and Viikki science library		
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Supervisors researcher Juho Hautsalo (Luke), docent Kristiina Himanen (HY), researcher Mirko Pavicic (HY) and professor Jari Valkonen (HY)		

Sisällys

1 JOHDANTO	6
2 KAURA	7
2.1 Kaura viljelykasvina	7
2.2 Morfologia	8
2.3 Kehitys ja kasvu	11
2.4 Kukinta	12
2.5 Kauran yleisimmät taudit ja tuholaiset Suomessa	13
3 FUSARIUM-SUKU PUNAHOMEEN AIHEUTTAJANA	16
3.1 <i>Fusarium</i> -suvun taudinaiheuttajat	16
3.2 Mykotoksiinit	17
3.3 Punahometta aiheuttavien <i>Fusarium</i> -suvun sienten elinkierto, punahomeinfektion oireet ja tartuntaa suosivat olosuhteet	18
3.4 Resistenssi punahometta vastaan	21
3.5 Kauran punahomeresistenssijalostuksen tila	22
4 KASVIEN KUVANTAMISMENETELMÄT	24
4.1 Klorofyllifluoresenssikuvaukset	24
4.2 RGB-kuvaukset	25
4.3 Hyperspektrikuvaus	26
4.4 Lämpökamerakuvaus	27
4.5 Fenotyyppaustekniikoiden käyttö kasvipatologisessa tutkimuksessa	28
5 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	32
6 AINEISTO JA MENETELMÄT	33
6.1 Kasvimateriaali	33
6.2 Kauran kasvun ja morfologian seurantakoe	34
6.2.1 Koemateriaalin kasvatus	34
6.2.2 Kuva-aineiston keruu ja analysointi	36
6.3 Tartutusmenetelmä lajike- ja kasvatusalustojen vertailukokeissa	37
6.4 Fluoresenssiaineiston keruu ja analysointi lajike- ja kasvatusalustojen vertailukokeissa	40
6.5 Kasvatusalustojen vertailukoe	42
6.5.1 Kokeen kulku	42
6.5.2 Fluoresenssi- ja kuva-aineiston keruu ja analysointi	43
6.6 Lajikevertailukoe punahometartutuksilla	44

6.6.1 Koemateriaalin kasvatus ja kokeen kulku.....	44
6.6.2 Fluoresenssi- ja kuva-aineiston keruu ja analysointi	46
7 TULOKSET	47
7.1 Kauran kasvun ja morfologian seuranta	47
7.1.1 Ympärysmitta.....	47
7.1.2 Havainnot genotyyppien kukinnan aikaisuudesta.....	49
7.2 Kasvatusalustojen vertailu	49
7.3 Lajikkeiden vertailu	53
7.3.1 Fotosynteesin heikkeneminen tähkylöissä.....	53
7.3.2 Infektion eteneminen	55
8 TULOSTEN TARKASTELU	57
8.1 Kasvun ja morfologian seurantakoe	57
8.2 Kasvatusalustojen vertailukoe	59
8.3 Lajikevertailukoe punahometartutuksilla	60
9 JOHTOPÄÄTÖKSET	63
10 KIITOKSET	64
11 LÄHTEET	64
LIITE 1: TULOKSET SIVULTA KUVATUN YMPÄRYSMITAN VARIANSSIANALYYSEISTÄ KAURAN KASVUN JA MORFOLOGIAN SEURANTAKOKEESSA	75

1 JOHDANTO

Kaura (*Avena sativa* L.) on tärkeä viljelykasvi Suomessa ja kiinnostus sitä kohtaan sekä kotimaisessa käytössä että vientituotteena on kasvanut viime aikoina. Suomalaisesta kaurasta valmistetuille elintarvikkeille on haluttu luoda vahva tavaramerkki laadukkaana ja puhtaana ruokana. Uusia kauraan pohjautuvia innovaatioita nyhtökaurasta erilaisiin terveystuotteisiin ja välipaloihin onkin kehitetty viime vuosina runsaasti. Haasteen suomalaiselle kaurantuotannolle asettavat *Fusarium*-suvun kasvitautinaiheuttajien aiheuttamat punahomeet sekä punahomeinfektion myötä kauraan kertyvät sienen tuottamat myrkylliset yhdisteet, mykotoksiinit, joille kauran on todettu olevan muita viljoja alttiimpi (Parikka ym. 2010). Mykotoksiinit aiheuttavat etenkin sääolosuhteiltaan punahomeen kannalta edullisina vuosina riskin kauran elintarvike- ja rehukäytölle. Punahomeiden aiheuttamilla haasteilla on riski kasvaa tulevaisuudessa, sillä punahometta suosivien olosuhteiden on ennustettu yleistyvän ilmastonmuutoksen myötä (Parikka ym. 2012).

Yksi tärkeimmistä ja tehokkaimmista keinoista hallita punahomeista ja niiden tuottamista toksiineista aiheutuvia riskejä on taudinkestävien kauralajikkeiden jalostus ja käyttö. Kauran kestävyysjalostuksen haasteena ovat kuitenkin punahomeen oireiden näkymättömyys ja puutteellinen tuntemus tautiresistenssin lähteistä. Erilaisten fenotyyppaustekniikoiden, kuten värikuva (RGB) -, klorofyllifluoresenssi-, hyperspektri- ja lämpökamerakuvauksen, soveltaminen tautiresistenssin tutkimiseen tarjoaa kasvinjalostajille entistä tehokkaampia keinoja taudinkestävyyden suhteen tehtävään valintajalostukseen. Eri fenotyyppaustekniikoiden käyttökelpoisuus taudinkestävyyden tutkimiseen ja resistenssilähteiden etsimiseen, sopivien koemallien kehittäminen punahomeen tartutukseen ja infektion seurantaan sekä kerätyn aineiston analysointi vaatii uutta tutkimusta, jotta kasvinjalostajille löydettäisiin parhaat mahdolliset työkalut tehokkaaseen valintajalostukseen. Kauran taudinkestävyyden parantaminen punahomeita vastaan on osaltaan työtä ilmastonmuutoksen myötä lisääntyviin kasvinsuojelun haasteisiin vastaamisessa, kotimaisen laadukkaan ja omavaraisen ruoantuotannon turvaamisessa ja kasvintuotannon kannattavuuden parantamisessa.

Tämä maisterintutkielma on toteutettu osana Luonnonvarakeskuksen (Luke) ja Helsingin yliopiston yhteistä FusNaPPI-hanketta, jonka tarkoituksena oli hyödyntää Helsingin yliopistolla käytössä olevaa kansallista kasvien fenotyypausinfrastruktuuria (NaPPI) punahomeresistenssin tutkimiseen. Hankkeessa kehitettiin menetelmät kauran ja kauran punahomeilla tartutettujen tähkylöiden fenotyypaukseen NaPPI-laitteistoissa. Kehitetyillä menetelmillä pyrittiin lisäksi erottamaan kauran kukissa esiintyvälle *Fusarium*-sienten aiheuttamalle punahomeinfektiolle vastustuskykyisiä kauragenotyypppejä, seuraamaan kasvien kasvua ja morfologiaa sekä punahometartunnan etenemistä ja tutkimaan punahomeresistenssiin vaikuttavia tekijöitä.

2 KAURA

2.1 Kaura viljelykasvina

Kaura eli peltokaura on yksivuotinen viljelykasvi. Kaura luokitellaan kuuluvaksi yksisirkkaisten (*Liliopsida*) heimoon heinäkasvit (*Poaceae*) ja sukuun kaurat (*Avena*) (Mossberg ja Stenberg 2003). Tunnusomaisia piirteitä *Avena*-suvun kasveille ovat avoimet tupet, harsu röyhy, kookkaat ja nuokkuvat tähkylät, keskenään samanpituiset kaleet sekä kalvomaiset ulkohelpeet (Mossberg ja Stenberg 2003). Kaura on 70–120 cm pitkä, kalju ja sen röyhy on tavallisesti 10–20 cm pitkä ja sirottavahaarainen. Tähkylät ovat pituudeltaan 17–30 mm ja niissä on kahdesta kolmeen kukkaa. Ulkohelpeet ovat kaljut, lovikärkiset ja voivat olla joko vihneettömät tai pitkävihneiset (Mossberg ja Stenberg 2003).

Kaura on viljelypinta-alassa tarkasteltuna merkittävä viljelykasvi Suomessa ja kotimaisista viljoista sen viljelyala oli vuosina 2016 ja 2017 ohran (*Hordeum vulgare* L.) jälkeen toiseksi suurin (Luke 2018a). Vuonna 2017 kauraa viljeltiin 337 400 hehtaarilla, mikä vastaa 17 prosenttia viljellystä alasta kyseisenä vuonna. Pinta-alassa mitattuna kauraa viljeltiin eniten Etelä-Pohjanmaalla (Luke 2018b). Kauran kokonaissato vuonna 2017 oli 1 013,9 miljoonaa kiloa (Luke 2018c). Vuonna 2017 kauraa vietiin Suomesta 347,5 miljoonaa kiloa (Luke 2018d). Suomi on tärkeä kauran vientimaa ja vuonna 2016 Suomi olikin toiseksi suurin kauran viejä Kanadan jälkeen (FAOSTAT 2017). Kauran kotimainen käyttö vuonna 2017 oli 677,3 miljoonaa kiloa, josta suurin osa kului

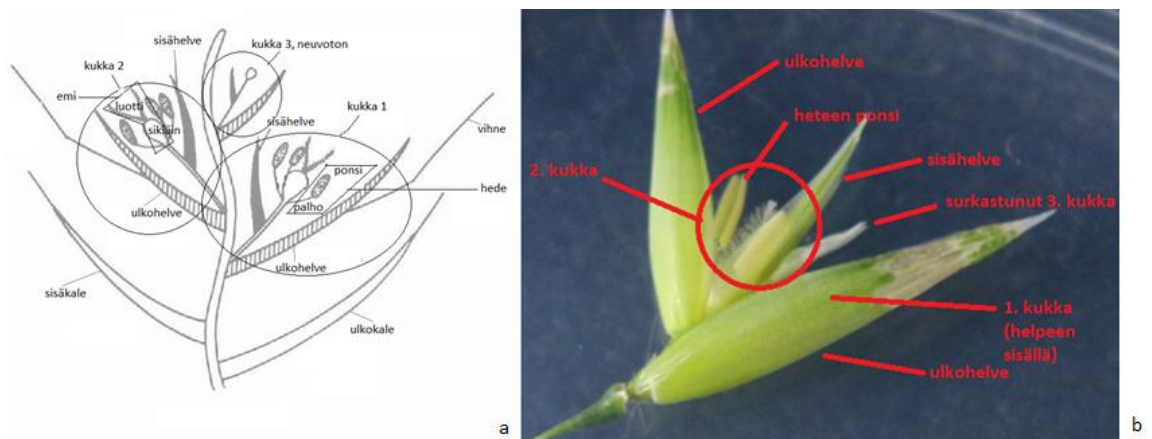
rehukäyttöön. Ruuan bruttokäyttöä kauralla oli 66,7 miljoonaa kiloa jyväpainoisena jauhatusmääränä (Luke 2018d). Kauraa kulutettiin elintarvikkeena Suomessa 7 kiloa henkilöä kohti vuonna 2017 ja 6 kiloa vuonna 2016 (Luke 2018e). Kauran sisältämällä beta-glukaanilla on todettu olevan positiivisia terveysvaikutuksia (EFSA 2011). EFSA:n mukaan beta-glukaani auttaa ylläpitämään normaalia veren LDL-kolesterolipitoisuutta ja hillitsemään veren glukoositason nousua aterian jälkeen. Kauran kulutus vaikuttaisi kasvaneen erityisesti viime vuosina verrattuna 1980–90-lukujen tilanteeseen (Luke 2018e). Vuonna 2017 kauran kokonaistuonti Suomeen oli 18,2 miljoonaa kiloa. Tuonnin määrä on selvästi kasvanut vuosituhaten alkupuolelta, jolloin kauraa tuotiin alle miljoona kiloa vuosittain (Luke 2018d). Kansallisen viljastrategian 2012–2020 väliraportin mukaan kauran kotimainen kysyntä on kehittymässä suotuisampaan suuntaan (VYR ja PTT 2016). Myös vientikysynnän kasvu voi vaikuttaa positiivisesti kauran hintakehitykseen.

Suomessa on viljelyksessä vuosittain noin 60 kauralajiketta. Viljellyimmät lajikkeet vuonna 2017 olivat Akseli, Belinda, Meeri ja Avanti (Mavi 2017). Akselin osuus kauran viljelypinta-alasta oli 13,46 prosenttia. Akseli oli viljellyin lajike myös vuonna 2016 sen osuuden viljelypinta-alasta ollessa 17,94 prosenttia (MML 2016). Vuonna 2016 Akselia seurasivat suosituimmuusjärjestyksessä Belinda, Veli ja Ringsaker.

2.2 Morfologia

Kauran morfologia on pitkälti samanlainen, kuin muilla kotimaisilla viljoilla. Merkittävimpänä erona vehnään (*Triticum aestivum* L.), ohraan ja rukiiseen (*Secale cereale* L.) on se, että kauran kukinto on tähkän sijaan röyhy. Kauran röyhy on löyhä ja avoin (Peltonen-Sainio ym. 2005). Röyhyn pääakseli on korren jatketta, jossa on niveliä ja pidentyneitä nivelvälisiä. Pääakselin nivelistä haarautuu röyhyn primaarisia haaroja, joista erkaantuu edelleen sekundaarisia haaroja. Jokainen haara päättyy tähkylään (kuva 1). Tähkylään kehittyviä jyviä suojaavat kukan ulkopuolella olevat kaleet, joista ei kuitenkaan muodostu jyvän kuoria. Kaleiden sisäpuolella jokaisessa muodostuvassa kukassa ovat varsinaiset kukkaosat ulko- ja sisähelve, kauna, emi ja heteet. Sisä- ja ulkohelpeistä muodostuvat jyviä suojaavat kuorirakenteet. Kuorettomilla kauragenotyypeillä kuori on ohut ja paperimainen ja se irtoaa kehittyneestä jyvistä varsin helposti puinnin yhteydessä toisin kuin kuorellisilla genotyypeillä (Burrows 2011).

Kuorettomuus ilmenee monilla kuorettomilla genotyypeillä kuitenkin epätäydellisesti siten, että tähkylöiden primaariset ja sekundaariset jyvät tavallisesti ovat kuorettomia, mutta näitä myöhemmin kehittyneet saattavat olla kuorellisia. Helpeiden sisäpuolella on kauna, joka turvotessaan edistää helpeiden avautumista ja siten emin pölyttymistä (Peltonen-Sainio ym. 2005). Emi muodostuu sikiäimestä ja siitepölyn vastaanottavista luoteista. Heteen osat puolestaan ovat varsinainen siitepölyä levittävä ponsi ja sen varsimainen osa, palho.



Kuva 1. Tähkylän rakenne (Tieteen termipankki 2014a). Kaavakuva kolmikukkaisesta tähkylästä (a) ja kaksi kukkaa kehittänyt tähkylä, josta kaleet on poistettu (b).

Kauran tähkylään voi muodostua useita kukkia, mutta yleensä kahdesta kehittyy jyvä (Peltonen-Sainio ym. 2005). Erittäin suotuisissa oloissa voi myös muodostua kolmas, niin kutsuttu välijyvä. Kyky muodostaa välijyviä ei ole toivottu ominaisuus, koska välijyvät lisäävät sadon jyväkoon vaihtelua sekä pienten ja kuoripitoisten jyvien osuutta. Kukkia voi muodostua kauran tähkylään kuitenkin jopa kuusi. Kuorettomilla genotyypeillä kukkia muodostuu yksittäiseen tähkylään tyypillisesti useampia, kuin kuorellisilla (Burrows 2011). Tyypillinen kukkien lukumäärä kuorettomien genotyyppien tähkylöissä on 2-10, kun kuorellisilla genotyypeillä esiintyy tavallisesti yhdestä kolmeen kukkaa. Fertiileistä kukista muodostuu lopulta pölyttymisen seurauksena jyvä eli pähkylä. Jyvän rakenne voidaan jakaa karkeasti kolmeen osaan, leseisiin, endospermiin, ja alkioon (Fulcher 1986; Delcour ja Hoseney 2010). Helpeiden alla sijaitsevat leseet koostuvat hedelmäseinästä, siemenkuoresta ja aleuronikerroksesta. Endospermin tärkkelystä hajottavia entsyymejä sisältävä aleuronikerros sijaitsee siemenkuoren ja endospermin välissä (Tieteen termipankki 2014b). Ravintorikkaiden leseiden sisältämiä yhdisteitä ovat

proteiinit, lipidit, feruliinihappo, aromaattiset amiinit, niasiini ja fytiini (Fulcher 1986). Endospermi on alkion ravintovarasto ja toimii tärkkelyksen, proteiinien ja beta-glukaanin lähteenä. Alkio sisältää rasvoja, antioksidantteja, vitamiineja ja mineraaleja (Delcour ja Hoseney 2010). Vaikka kotimaisten viljojen jyvät ovat morfologialtaan ja kemialliselta koostumukseltaan pitkälti samanlaisia, on kauralla joitakin vain sille tyypillisiä piirteitä. Esimerkiksi kauran aminohappokoostumus poikkeaa vehnästä, ohraista, rukiista ja maissista (*Zea mays* L.), ja on ravitsemuksellisesti korkealaatuinen (Fulcher 1986). Proteiini- ja rasvapitoisuus ovat kauralla suuremmat, kuin muilla viljoilla. Kauran tärkkelys on eri tavalla varastoituneena, kuin muilla viljoilla, sillä kauran tärkkelysjyvät ovat muodoltaan sileitä ja epäsäännöllisiä. Lisäksi vehnästä ja rukiista poiketen kauran jyvä on lukuisten solukarvojen peittämä (Delcour ja Hoseney 2010).

Kauran version morfologia on muilta osin samanlainen, kuin muilla kotimaisilla viljoilla. Verso muodostuu nivelistä ja nivelväleistä (Peltonen-Sainio ym. 2005). Version ensimmäinen nivel on nimeltään koleoptiilinivel. Sen yläpuolinen nivelväli pitenee, kunnes se on saavuttanut maanpinnan. Maanpinnan läheisyydessä olevat nivelvälit pitenevät vain hyvin vähän ja siksi viljakasvin sanotaan pensastuvan ennen korrenkasvun alkamista. Jokaisessa version nivelessä on sivuversion aihe, mutta ainoastaan maanpinnan läheisyydessä olevista nivelistä kehittyy sivuversoja (Peltonen-Sainio ym. 2005). Ylemmät version nivelvälit kasvavat pituutta ja muodostavat kasvin onton korren. Jokaiseen korren niveleen muodostuu pitkänomainen, kapea lehti. Nivelen yläpuolisen nivelvälin ympärille kietoutuu lehtituppi ja korresta poispäin erkaantuu lehtilapa. Heinäkasveilla lajista ja lajikkeesta riippuen löytyvät kieleke ja korvakkeet lehtilavan ja -tupen yhtymäkohdassa. Kielekkeiden ja korvakkeiden esiintyminen ilmentää laji- ja lajiketyypillisiä piirteitä. Kauralla korvakkeita ei ole.

Viljakasveilla on kahdenlaisia juuria (Peltonen-Sainio ym. 2005). Siemenjuuret lähtevät aivan siemenen tuntumasta ja ne tunkeutuvat syviin maakerroksiin. Niiden tehtävänä on turvata kasvin veden saanti. Viljakasveilla on myös ruokamultakerroksessa kasvavia ravintojuuria, joiden tehtävänä on huolehtia kasvin ravinteiden saannista.

2.3 Kehitys ja kasvu

Kauran, kuten muidenkin heinäkasvien, kehitys jakautuu suvuttomaan vegetatiiviseen ja suvulliseen generatiiviseen vaiheeseen (Peltonen-Sainio ym. 2005). Uuden kasviyksilön kehitys alkaa jyvän kostumista seuraavalla itämisellä, jossa itutuppi työntyy maan pinnalle, sirkkalehti avautuu ja yhteyttäminen alkaa jyvän vararavinnon turvin. Suvuttomassa kehitysvaiheessa, jossa erilaistuu ainoastaan vegetatiivisia kasvinosia, kärkikasvupiste pysyy vielä maanpinnan tason alapuolella. Ensin kärkikasvupisteestä erilaistuvat lehtiaiheet ja sivuversojen aiheet (Bonnett 1966). Ensimmäiset lehdet kasvavat, kun korsi pysyy vielä lyhyenä. Sivuversoja kehittyy Suomen oloissa yleensä kolmesta neljään (Peltonen-Sainio ym. 2005). Ne kehittyvät jäljessä pääversion tahdista, sillä pääverso dominoi niiden kasvua. Ne eivät myöskään tuota yhtä paljon satoa kuin pääverso. Suotuisissa oloissa sivuversot tarjoavat pääversolle yhteyttämistuotteita ja siten voivat kasvattaa pääversion satopotentiaalia.

Generatiivinen kehitysjakso alkaa yleensä, kun kuudesta seitsemään lehtiaihetta on kehittynyt ja kaksi ensimmäistä on työntynyt esille (Peltonen-Sainio ym. 2005). Oraan kaksilehtivaiheessa kärkikasvupiste sijaitsee vielä hieman maanpinnan alapuolella. Kärkikasvupiste nousee maanpinnan yläpuolelle, kun korrenkasvu alkaa ylempien solmuvälien pidentyessä (Bonnett 1966; Peltonen-Sainio ym. 2005). Ensimmäinen suvullinen kehitysvaihe on nimeltään kaksoiskehävaihe. Siinä kärkikasvupisteestä erilaistuu sekä lehtiaiheita että tähkylänaiheita (Peltonen-Sainio ym. 2005). Kehittyvään röyhyyn erilaistuvat lehtiaiheet eivät kuitenkaan kehity lehdiksi. Kaksoiskehävaiheen jälkeen tähkylä- ja kukkaosat alkavat erilaistua tähkylänaiheisiin. Ensimmäiseksi kehittyy pääversion kärjen tähkylä (Bonnett 1966). Tämän jälkeen seuraavat röyhyn primääristen haarojen kärjissä olevat tähkylät ja edelleen sekundääristen haarojen tähkylät. Kauran röyhy kehittyy ylhäältä alaspäin ja jokaisesta nivelestä haarautuvan röyhyn haarassa kärjestä kohti vartta. Tähkylänaiheista ensimmäisenä erilaistuvat kaleet, joita seuraavat erilaistumisjärjestyksessä ulkohelve, heteet, sisähelve, kauna ja emiö. Emiöön puolestaan erilaistuu järjestyksessä sikiäin, vartalo ja luotit (Bonnett 1966). Kun pisimmällä kehityksessä olevan tähkylän ensimmäinen kukka tulee pölyttyneeksi, liian varhaisessa vaiheessa olevat kukat lopettavat kehityksensä ja kuihtuvat. Näiden abortoituvien kukkien osuus voi olla hyvinkin suuri, jopa 80 prosenttia erilaistuneista

kukista (Bonnett 1966). Niin kutsutussa satoisuusikkunassa, joka Suomen oloissa on noin kaksi viikkoa ennen röyhylle tuloa, erilaistuu suurin osa kukista. Siksi tämän ajankohdan olosuhteet ovat hyvin merkityksellisiä satopotentiaalin toteutumisen kannalta.

2.4 Kukinta

Kauran kukinnan aloittaa pääversion röyhy ja myöhemmin myös sivuversojen röyhyt aloittavat kukinnan (Misonoo 1936). Yhden kasvin kukkiminen kestää olosuhteista riippuen keskimäärin kaksi viikkoa (Callaghan 1931). Kukinta alkaa röyhyn ylimmistä tähkylöistä ja etenee nivelittäin alaspäin röyhyssä (Misonoo 1936). Röyhyn kärkitähkylä aloittaa kukinnan noin päivää ennen muita tähkylöitä. Yksittäinen röyhy kukkii olosuhteista riippuen keskimäärin viikosta kymmeneen päivään. Pääversion röyhyn kukinta kestää yleensä hieman pidempään, kuin sivuveroissa. Muista viljoista poiketen kauran kukat ovat avoimina tavallisesti iltapäivällä (Callaghan 1931; Misonoo 1936). Kaura kukkii olosuhteista riippuvana ajankohtana ja yhden päivän kukinta yksittäisellä kukalla kestää keskimäärin tunnin ajan.

Kauran kukkiessa kaleet erkaantuvat toisistaan ja kaunan turvotessa sisä- ja ulkohelve avautuvat (Callaghan 1931). Kukinnan alkaessa heteiden ponnet ovat pullistuneet ja muuttuneet vihertävän keltaisista kypsänkeltaisiksi. Kun helpeet avautuvat, heteiden palhot kasvavat pituutta, jolloin ponnet työntyvät helpeiden ulkopuolelle (Callaghan 1931; Misonoo 1936). Ponnet levittävät siitepölyä ja emin luotit tulevat kykeneväisiksi vastaanottamaan sitä (Misonoo 1936). Heteiden ponsista siitepölyä siirtyy suoraan saman kukan emin luoteille, jolloin kukka pölyttyy. Kun ponnet työntyvät ulos helpeiden välistä ne levittävät siitepölyä ilmaan. Pölytys voi siis tapahtua joko itse- tai ristipölytyksenä. Kun heteet roikkuvat helpeiden ulkopuolella, pölytyminen on jo tapahtunut. Pölyttymisen seurauksena siitepöly hedelmöittää emin ja jyvän muodostuminen alkaa (Peltonen-Sainio ym. 2005).

Lämpötilan ja ilmankosteuden vaihtelut vaikuttavat kauran kukintaan (Callaghan 1931; Misonoo 1936; Nishiyama 1970). Suotuisat olosuhteet kukkimiselle ovat sään ollessa hiostava, kun ilma on lämmin ja kostea (Callaghan 1931). Tällaiset olosuhteet voivat ilmetä esimerkiksi sadepäivää seuraavana päivänä. Jos lämpötila on alle 15-17°C ja ilma on kuiva, kukinta viivästyy muutamalla tunnilla verrattuna lämpimän ja kostean päivän

tilanteeseen. Kaura kykenee viivästyttämään kukinnan aloittamista joidenkin kukkien osalta kahdellakin päivällä, mikäli olosuhteet eivät ole kukinnan kannalta otollisia. Kukinta etenee epäsuotuisissakin oloissa, mutta ei kuitenkaan täyskukintaan asti. Lisäksi kuumuus voi viivästyttää kukinnan alkamista (Callaghan 1931). Misonoon (1936) havaintojen mukaan päivinä, joina kauran todettiin kukkineen, lämpötila vaihteli kukinta-aikaan välillä 14-29,8°C. Lämpötilan vaihtelu vuorokauden aikana vaikutti läheisesti kukinnan toteutumiseen. Päivinä, jolloin kaura ei kukkinut, lämpötilan vaihtelut olivat pieniä verrattuna niihin päiviin, jolloin kukinta tapahtui (Misonoo 1936). Nishiyama (1970) on lisäksi todennut lämpötilan vaihteluiden vaikuttavan kukinnan alkamiseen myös muilla *Avena*-suvun lajeilla. Nishiyaman (1970) havaintojen mukaan vuorokauden korkeimman lämpötilan esiintyminen varhemmin päivällä aikaisti kukintaa verrattuna päiviin, jolloin vuorokauden korkein lämpötila saavutettiin myöhemmin päivällä.

Suhteellisen ilmankosteuden vaikutuksesta kauran kukintaan Misonoo (1936) on todennut, että kauran kukintapäivinä suhteellisen ilmankosteuden vaihtelut olivat suurempia, kuin päivinä, joina kaura ei kukkinut. Myös vuorokauden alimman ilmankosteuden esiintyminen vuorokauden aikana vaikutti kukinnan ajankohtaan. Mikäli alin ilmankosteus esiintyi varhemmin, myös kauran kukinta alkoi aiemmin kyseisenä päivänä (Misonoo 1936). Misonoo (1936) totesi lisäksi, että vuorokauden sademäärä, tuulennopeus sekä auringonpaiste ja -valo eivät suoraan vaikuta kukinnan alkamiseen ja sen ajankohtaan.

2.5 Kauran yleisimmät taudit ja tuholaiset Suomessa

Koska ilmastonmuutos voi tulevaisuudessa suosia monelle kasvintuhoojalle suotuisia olosuhteita, on kasvinterveyteen panostaminen niin kasvinsuojelutoimenpiteiden kuin kasvinjalostuksen muodossa ensiarvoisen tärkeää. Kauralla esiintyvät taudit poikkeavat osittain muilla kotimaisilla viljoilla esiintyvistä taudeista. Monet kauran taudinaiheuttajat eivät tartuta vehnää, ohraa ja ruista. Joitakin näille viljoille tyypillisiä tauteja esiintyy kuitenkin myös kauralla. Tavallisimpia kauraa tartuttavia sienitauteja ovat kauranavonoki (*Ustilago avenae* (Pers.) Rostr.), kauran lehtilaikku (*Drechslera avenae* (Eidam) Scharif / *Pyrenophora chaetomioides* Speg.), härmä (*Blumeria graminis* (DC.) Speer), mustaruoste (*Puccinia graminis* Pers.), rengasruoste (*Puccinia coronata*

Corda) sekä tyvitaudit ja punahome (*Fusarium sp.*) (Jalli ja Parikka 2012). Lisäksi vähemmän merkityksellisinä sienitauteina kauralla voi esiintyä pantterilaikkua (*Ramularia collo-cygni* Sutton & Waller), mustatyveä (*Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx & D.L. Olivier) ja tyvilaikkua (*Pseudomonas herpotrichoides*). Useimpien sienitautien tapauksessa, lämmin ja kostea sää suosii infektion kehittymistä ja leviämistä. Bakteeritauodeista kauralla esiintyy Suomessa kehälaikkua (*Pseudomonas syringae* Van Hall). Lisäksi kauralla esiintyy myös virustauteja, joista tyypillisimpiä ovat viljan kääpiökasvuviroosi (*Barley yellow dwarf virus*) ja kauran tyviversoviroosi (*Oat sterile dwarf virus*) (Jalli ja Parikka 2012). Keskeisimpiä kauran tuholaisia ovat puolestaan tuomikirvat (*Rhopalosiphum padi* L.), viljakirvat (*Sitobion avenae* F.), elokirvat (*Metopolophium dirhodum* Wlk.), viljakukko (*Oulema melanopus* L.), kahukärpänen (*Oscinella frit* L.) ja viljakaskas (*Calligypona pellucida* F.) (Jalli ja Parikka 2012).

Kauranavonoki on röyhyissä esiintyvä kasvitauti, joka tuhoaa tähkylöiden kaikki osat muuttaen ne mustaksi itiöpölyksi. Taudin itiöt leviävät tuulen mukana uusiin yksilöihin, joiden jyvissä tauti talvehtii kuoren alla tai halkeamissa (Jalli ja Parikka 2012). Kauran lehtilaikku on pääasiassa kylvösiemenen, mutta myös olki- ja sänkijätteen välityksellä leviävä lehtilaikkutauti. Taudin tartuttamiin lehtiin syntyy ensin pieniä punaisia pistemäisiä laikkuja, jotka muuttuvat myöhemmin epämääräisen muotoisiksi ja kellertävän punaruskeiksi. Mikäli lehtilaikun tartunta tapahtuu röyhyn esiintulon aikaan, lehdet voivat kuloutua ennenaikaisesti, mikä voi aiheuttaa sateisina vuosina merkittäviä satotappioita (Jalli ja Parikka 2012). Mustaruoste on kaikilla viljoilla vakavia tuhoja aiheuttava sienitauti (Jalli ja Parikka 2012). Mustaruoste leviää tuulen mukana kulkeutuvien itiöiden välityksellä. Berlin ym. (2013) ovat todenneet, että taudilla on potentiaalia nopealle leviämiselle kaurapellon sisällä.

Rengasruoste on ainoastaan kauralla ja eräillä muilla heinälajeilla esiintyvä ruostetauti (Jalli ja Parikka 2012). Sille on tunnusomaista mustat talvi-itiöryhmät, jotka ympäröivät punaruskeita kesäitiöryhmiä kasvin lehdillä. Suomessa rengasruoste-epidemiat ovat aikaistuneet ja tauti voi aiheuttaa merkittäviä satotappioita (Jalli ja Parikka 2012). Suomessa käytettävillä lajikkeilla kestävyys rengasruostetta vastaan on todettu olevan heikkoa. *Fusarium*-suvun aiheuttamia tyvitauteja esiintyy kauralla, kuten muillakin viljoilla ja taudinaiheuttajia esiintyy Suomessa lähes kaikilla viljapelloilla (Jalli

ja Parikka 2012). Yleisimmät tyvitautilien aiheuttajat ovat *F. avenaceum* (Fr.) Sacc. ja *F. culmorum* (W. G. Sm.) Sacc.. Epäsuotuisten olosuhteiden, kuten epäedullisten sääolojen ja maalajien sekä yksipuolisen viljelyn tapauksessa tyvitaudit voivat aiheuttaa suuria satotappioita ja pahimmillaan ne voivat tuhota koko sadon. *Fusarium*-suvun taudinaiheuttajat aiheuttavat tyvitautilien lisäksi kauran röyhyissä ja muiden viljojen tähkissä punahometta. *Fusariumin* aiheuttamaa punahometta tarkastellaan syvemmin luvussa 3. Viljan kääpiökasvuviroosi (BYDV) on tärkein viljakasvien virustauti Suomessa ja se aiheuttaa hankaliakin epidemioita erityisesti vuosina, jolloin tuomikirvoja esiintyy runsaasti (Tapio ym. 1997). Kaura on viljoista alttein kääpiökasvuviroosille eikä alttiudessa ole viljeltävien lajikkeiden välillä merkittävää eroa. Tuomikirvat toimivat virustaudin vektoreina ja ne levittävät tautia luonnonvaraisista ja viljellyistä heinikoista ruokaillessaan niissä (Jalli ja Parikka 2012).

Kirvat aiheuttavat muutamia kertoja kymmenessä vuodessa runsaasti esiintyessään suuriakin sadonmenetyksiä viljoilla (Jalli ja Parikka 2012). Eri kirvalajit esiintyvät tyypillisesti yhdessä, mutta tuomikirva on niistä yleisin. Pahimpia vioituksia tuomikirva aiheuttaa kauralle ja ohralle ja vaikeimpina kirvavuosina niiden aiheuttama satotappio voi olla 20–30 prosenttia. Kirvat aiheuttavat versojen määrän vähenemistä ja jyvien painon laskua, joista kummatkin selittävät noin puolet satotappiosta. Lisäksi kirvojen levittämä viljan kääpiökasvuviroosi lisää satotappiota etenkin vuosina, jolloin viljojen orastuminen jää myöhäiseksi. Viljakukko on kovakuoriainen, joka aiheuttaa melko harvoin ja paikallisesti tuhoa viljoille. Sen on kuitenkin todettu mahdollisesti hyötyvän ilmastonmuutoksesta ja sen aiheuttamat tuhot voivatkin tulevaisuudessa lisääntyä. Kahukärpäset ovat kevätiljojen oraita vioittavia tuholaisia, jotka aiheuttavat sadonmenetyksiä etenkin vuosina, jolloin kevätiljojen kylvö viivästyy. Suomessa kahukärpäset ovat olleet toistaiseksi vain vähän merkityksellisiä viljojen tuholaisia, mutta Ruotsissa ne ovat olleet hankalia kauran tuholaisia. Viljakaskaat ovat suorakylvön lisääntymisen myötä yleistyneitä tuholaisia, jotka voivat levittää kauran tyviversoviroosia (Jalli ja Parikka 2012).

3 *FUSARIUM*-SUKU PUNAHOMEEN AIHEUTTAJANA

3.1 *Fusarium*-suvun taudinaiheuttajat

Kauran röyhyssä ja muiden viljojen tähkissä esiintyvää punahometta aiheuttavat *Fusarium*-suvun taudinaiheuttajat. *Fusarium*-sukuun tiedetään nykyisin kuuluvan noin 140 lajia (Thrane 2010). Niistä tyypillisimpiä Suomessa viljassa esiintyviä taudinaiheuttajia ovat *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* Schwabe, *F. langsethiae* Torp & Nirenberg, *F. poae* (Peck) Wollenw. ja *F. sporotrichioides* Sherb. Sacc. (Hietaniemi ym. 2016). Suvun taudinaiheuttajat tuottavat mykotoksiineita, jotka ovat lajista riippuen pääasiassa trikotekeenejä, fumoniineja ja tsearalenonia. Trikotekeenit jaetaan A- ja B-tyypin trikotekeeneihin. A-tyyppiin kuuluvat toksiinit T-2, HT-2 sekä diasetoksiskirpenoli ja tyyppiin B lukeutuvat nivalenoli (NIV) sekä deoksinivalenoli (DON) (Thrane 2010). Kukin *Fusarium*-suvun laji tuottaa omanlaisensa koostumuksen mykotoksiineita. Mykotoksiinit kertyvät punahometartunnan seurauksena viljan jyviin. *F. graminearum* on keskeinen DON-toksiinin tuottaja ja sen DNA:n ja DON-toksiinin esiintymisellä suomalaisissa viljoissa on löydetty selkeästi merkitsevä korrelaatio (Hietaniemi ym. 2016). *F. sporotrichioides* ja *F. langsethiae* ovat tulleet merkityksellisemmiksi taudinaiheuttajiksi Suomessa verrattuna 1970-lukuun (Hietaniemi ym. 2016). T-2 –toksiinia tuottava *F. langsethiae* on yleistynyt runsaasti vuodesta 2001 *F. poae* n kustannuksella. Myös *F. graminearum* merkitys Suomessa on kasvanut 1970-lukuun verrattuna, mikä on johtanut runsaisiin DON-toksiinin pitoisuuksiin viljoissa. Sen sijaan *F. culmorum* määrä viljoissa on vähentynyt. T-2, HT-2 ja DON –toksiinien pitoisuudet suomalaisissa viljoissa ovat vuodesta ja alueesta riippuen lisääntyneet aikavälillä 2002–2014. Toksiinien pitoisuudet riippuvat suuresti kasvukauden aikaisista ympäristöoloista, erityisesti kukinnan aikaan (Hietaniemi ym. 2016).

Ilmastonmuutoksen on ennustettu muuttavan Pohjois-Euroopan ilmastoa leudommaksi ja kosteammaksi, mikä suosii viljojen punahometartuntaa (Parikka ym. 2012). 2010-luvulle tultaessa sekä Keski- että Pohjois-Euroopassa ovat vallinneet samat *Fusarium*-suvun lajit. Erityisesti *F. graminearum* esiintyvyys on kuitenkin jo lisääntynyt Keski-Euroopassa ja Pohjois-Euroopassa sen on ennustettu lisääntyvän muuttuvien

sääolosuhteiden ja kevennetyn maanmuokkauksen lisääntymisen myötä. Eteläisessä Pohjois-Euroopassa ennustettu maissin viljelyalan lisääntyminen suosii myös *F. graminearumia*. Myös suhteellisen kuivissa oloissa infektoivien *F. langsethiaen* ja *F. poaen* merkitys syysviljakasvustoissa voi tulevaisuudessa kasvaa niiden viljelyalan lisääntyessä (Parikka ym. 2012).

3.2 Mykotoksiinit

Fusarium-sienten esiintyminen aiheuttaa niiden tuottamien mykotoksiinien vuoksi vakavan haasteen viljantuotannolle, sillä ne heikentävät viljan laatua ja voivat estää viljaerän käytön elintarvikkeena tai rehuna. Ihmisillä DON-toksiini voi aiheuttaa muun muassa pahoinvointia ja oksentelua ja eläimillä mahdollisia oireita ovat rehun hylkiminen, ripuli, oksentelu, ruokatorven verenvuoto ja kosketushottuma ovat (Goswami ja Kistler 2004). Norjassa *F. graminearumin* runsastuttua vehnässä ja kaurassa viime vuosina, myös DON-toksiinin kontaminaatiotaso niissä on samaan aikaan noussut, mikä on aiheuttanut ongelmia elintarvike- ja rehuteollisuudelle (Elen ym. 2010). Kaura on viljoista alttein punahomeelle. Suomessa korkeimmat DON-toksiinipitoisuudet onkin mitattu juuri kaurasta (Parikka ym. 2010). Kaurasta on mitattu myös melko korkeita T-2 ja HT-2 –toksiinien pitoisuuksia. Alttiuden vuoksi elintarvikekaurassa sallitaan korkeampi DON-pitoisuus, kuin muissa viljoissa. DON-toksiinin korkein sallittu pitoisuus elintarvikekaurassa on 1750 µg/kg (Euroopan komissio 2006).

DON-toksiinin pitoisuus jyvissä vaikuttaa myös itävyyteen (Tekle ym. 2013a). Heikentynyt itävyys liittyy korkeaan DON-pitoisuuteen, mutta alhainen DON-pitoisuus ei takaa parempaa itävyyttä. DON-toksiini ei ehkäise itämistä sinällään vaan viivästyttää taimen kasvua ja estää sen normaalin kehittymisen. Tekle ym. (2013a) totesivat kauran tartutuskokeiden perusteella, että kun *Fusariumin* tartutus tehtiin myöhemmässä kasvin kehitysvaiheessa, DON-pitoisuus oli pienempi ja itävyys parempi kuin varhemmassa kehitysvaiheessa tartutetuissa. DON-pitoisuus oli korkein, kun tartunta tehtiin viisi päivää kukinnan keskivaiheen jälkeen. Myöhemmissä tartutuksissa pitoisuus laski nopeasti osoittaen, että viikon poikkeavuudella tartunnan ajankohdassa on suuri merkitys toksiiniriskin kannalta (Tekle ym. 2013a). Tartunnan ajankohtaa verrattiin juuri kukinnan keskivaiheeseen, koska kauran kukinta yksittäisen röyhyn osalta kestää suhteellisen pitkään. Kukinnan keskivaiheella viitataan hetkeen, jolloin 50 prosenttia

röyhyn kukista on avoinna tai kukkii. DON-toksiinia esiintyy tyypillisimmin viljan kuoriosissa ja pienimmissä jyvissä, joten mykotoksiiniriskiä voi pienentää, kun viljan kuoret poistetaan ja pienimmät jyvät lajitellaan pois (Miller ym. 1985; Bjornstad ja Skinnnes 2008). Mykotoksiiniriskin hallinnassa kestävien lajikkeiden käyttö on tärkeää. Teklen ym. (2018) havaintojen mukaan DON-toksiinin pitoisuudet vaihtelivat sumutustartutuskokeeseen valituissa genotyypeissä kestävimmän 5,7 ppm:stä altteimman 19,8 ppm:ään. Kokeeseen valittiin sekä kestäviä kuorettomia ja kuorellisia että alttiita lajikkeita ja jalostuslinjoja. Vuoden 2016 kaupan ja teollisuuden vastaanottonäytteiden perusteella Suomessa viljelyssä olleista lajikkeista mittausten perusteella kestävimmissä DON-toksiinin mediaani oli 0,25 mg/kg, kun vastaavasti altteimmissa elintarvikekäytön raja-arvo 1,75 mg/kg ylittyi selkeästi (VYR 2016). Vuosi 2016 oli DON-toksiinin osalta kuitenkin haasteellinen. Lajikkeet, joissa elintarvikekäytön raja-arvo silloin ylittyi, saavuttivat edellisenä vuonna 2015 yhtä hyviä mediaaniarvoja, kuin havaintojen perusteella kestävät lajikkeet vuonna 2016. Vertaillessaan 40 kauragenotyyppiä, Tekle ym. (2018) totesivat Belindan itävyyden säilyneen punahomeinfektiosta huolimatta hyvänä, vaikka DON-toksiinia kertyi siihen suhteellisen runsaasti muihin tutkittuihin genotyypeihin verrattuna. Tässä suhteessa Belinda poikkesi analyysissä havaitusta yleisestä suuntauksesta, jossa itävyydellä ja DON-pitoisuudella havaittiin olevan negatiivista korrelaatiota. VYR:in (2016) vastaanottonäytteiden mukaan Belindan DON-mediaani ei vuosina 2014–2016 kuitenkaan ylittänyt arvoa 0,25 mg/kg. Pelto-olosuhteissa lajikkeiden todellista kestävyttä tuleekin tarkastella pitkällä aikavälillä, jotta vuosien välisen olosuhteista johtuvan vaihtelun vaikutus saadaan minimoitua. Lajikkeiden kestävyyseroja tarkastelevia erilaisia tutkimustuloksia vertailtaessa tulee myös ottaa huomioon käytetyn lajikeaineiston erot ja erot koepaikkojen olosuhteiden välillä.

3.3 Punahometta aiheuttavien *Fusarium*-suvun sienten elinkierto, punahomeinfektion oireet ja tartuntaa suosivat olosuhteet

Punahomeet talvehtivat saprofyyttisenä eli lahoavaa ainetta ravintonaan käyttävänä sienirihmastona tai kestoitiöinä kasvijätteessä (Parry ym. 1995). Punahomeen tartukkeen lähteenä voivat toimia kasvijäte, kuten sänki, saastunut kylvösiemen ja vaihtoehtoiset isäntäkasvit, kuten heinämaiset ja leveälehtiset rikkakasvit.

Punahometartunnan aiheuttajia voivat olla kuromaitiöt, kestoiitiöt ja *F. graminearumilla* myös koteloitiöt, jotka leviävät tuulen, sateen tai hyönteisten mukana isäntäkasvien pinnalle (Parry ym. 1995). Myös *Fusarium*-taudinaiheuttajien kasvukauden alkuvaiheessa aiheuttamat tyvitaudit muodostavat tärkeän punahometartunnan lähteen. Sieni kasvattaa kasvijätteen pinnalle suvuttomia kuromaitiöitä ja kotelopulloja, joiden kehittymistä lämmin ja kostea sää suosii (Sutton 1982; Goswami ja Kistler 2004). *F. graminearumilla* kypsät kotelopullot tuottavat suvullisia koteloitiöitä (Goswami ja Kistler 2004).

Itiöt kasvattavat rihmastoja aiheuttaen infektion, mikä tapahtuu yleensä viljan kukinnan aikaan, jolloin vilja on alttein tartunnalle (Goswami ja Kistler 2004; Tekle ym. 2012). Tähkylöiden pinnoilla kasvava sienirihma ei tunkeudu suoraan epidermin läpi vaan etsiyytään kukkien ja kaleiden ulkopinnoilla kohti ilmarakkoja tai muita heikkoja kohtia, joista se voi tunkeutua kukan sisään (Goswami ja Kistler 2004). Rihmasto pääsee kukan sisään myös avautuneiden helpeiden välistä, esiin työntyneiden heteiden kautta sekä kaleiden tyviosien kautta, missä epidermi ja parenkyyymi ovat ohutseinäisiä.

Tekle ym. (2012) totesivat, että *F. graminearumin* rihmasto kasvaa infektion alussa voimakkaimmin heteiden ponsissa verrattuna muihin kukkaosiin. Tyypillisesti infektio etenee kukan kärkiosista kohti tyveä. Tartunta alkaa tähkylän primaarisista kukista ja etenee kohti tertiäärisiä kukkia niiden fyysisen kontaktin välityksellä. Kauran röyhyssä kukkaperät hidastavat tartunnan leviämistä tähkylästä toiseen, sillä leviäminen tapahtuu juuri fyysisen kontaktin välityksellä tähkylästä toiseen. Tekle ym. (2012) havaintojen mukaan ensimmäiset näkyvät infektion oireet ilmaantuivat noin kolmen vuorokauden kuluttua tartutuksesta, mutta jo vuorokauden kuluttua rihmaston kasvua oli havaittavissa. Tartunnan tapahduttua *F. graminearum* elää tartunnan alussa hetken elävää kasvisolukkoa ravintonaan käyttävänä biotrofina, mutta muuttuu sitten kasvisolukkoa tappavaksi nekrotrofiksi alettuaan kolonisoida voimakkaammin kasvin osia (Goswami ja Kistler 2004). *F. graminearumin* aiheuttamalla punahometartunnalla on suurempi vaikutus kasviin, kun tartunta tapahtuu kukinnan aikana, kuin että se tapahtuu myöhemmin kukinnan jälkeen (Tekle ym. 2012).

Punahometartunnan näkyvinä oireina havaitaan infektion alussa pieniä rusehtavia ja märkiä laikkuja kukkien kärkiosissa (Parry ym. 1995; Tekle ym. 2012). Infektion edetessä

laikut leviävät kohti kukkien tyviosia (Tekle ym. 2012). Väriltään lohenpunaista tai punaista sienen kasvua on mahdollista nähdä kaleiden reunoilla ja tähkylöiden tyvellä. Infektoituneet jyvät kutistuvat ja muuttuvat harmaiksi tai ruskeiksi ja niiden sisältö jauhoiseksi ja paikoin värjäytyneeksi (Parry ym. 1995). Kaleiden pinnoilla esiintyy usein vaalentuneita alueita, jotka ovat ruskeiden värjäytymien ympäröimiä (Tekle ym. 2012). Punahometartunta muuttaa myös jyvien optisia ominaisuuksia (Tekle ym. 2013b). Enemmän DON-toksiinia sisältäneet jyvät olivat Teklen ym. (2013b) mukaan väriltään tummempia ja pintarakenteeltaan karkeampia verrattuna vähän DON-toksiinia sisältäneisiin jyviin. Tartunnan seurauksena tähkylät saattavat kuolla ennenaikaisesti ja ne haalistuvat. Erityisesti *F. graminearum* tartunnan vaikutuksesta pitkittyneiden lämpimien ja kosteiden jaksojen seurauksena aikaisin infektoituneissa röyhyissä voi esiintyä pilkkuisuutta, mikä johtuu pinnalle muodostuneista kotelopulloista. Ankara *Fusariumin* tartunta tekee jyivistä normaalia pienempiä, kuihtuneita ja väriltään vaaleita tai vaaleanpunaisia (Parry ym. 1995). Punahomeen seurauksena DON-toksiinia sisältävät jyvät itävät epänormaalisti (Tekle ym. 2013a). Itävän taimen alkeisjuuri ja itutuppi jäävät normaalia lyhyemmiksi sitä selvemmin, mitä enemmän DON-toksiinia jyvissä esiintyy.

Lämpimät ja kosteat olosuhteet erityisesti kauran kukinnan aikaan suosivat punahometartunnan syntymistä (Parikka ym. 2012). Runsas vesisade kukinnan aikaan levittää tehokkaasti tartuketta röyhyihin (Parry ym. 1995). Heinäkuussa sadanta lisää yleisesti ottaen *Fusariumin* esiintyvyyttä, mutta kuitenkin *F. graminearumia* suosii vähäinen sadanta heinäkuussa (Bernhoft ym. 2010). Lämmin ja kuiva sää kasvukauden alussa puolestaan edistää *Fusariumin* aiheuttaman tyvitaudin kehitystä, mikä siten edistää punahomeen tartunnan kehittymistä (Parry ym. 1995). *F. culmorum* hyötyy märistä olosuhteista ja *F. langsethiae* puolestaan aiheuttaa tartuntoja enemmän kuivina kasvukausina (Bjørnstad ja Skinnnes 2008). Ilmastomuutoksen myötä mahdollisesti lisääntyvät äärisääilmiöt altistavat myös infektiolle kasvattamalla tautia levittävien tuholaisten populaatioita (Parikka ym. 2012). Kokkonen ym. (2010) totesivat, että *Fusarium*-sienen kasvu ja toksiinien muodostus riippuvat muun muassa lämpötilasta sekä maaperän ravinnekoostumuksesta, ravinteiden saannista ja pH:sta. Sääolosuhteiden lisäksi myös viljelytekniset toimenpiteet vaikuttavat infektion määrään. *Fusarium*-tartuntaa lisäsivät Bernhoft ym. (2010) mukaan fungisidien ja

mineraalilannoitteiden käyttö sekä viljelykierron puute. Muiden viljelykasvien, kuin viljojen puuttuminen viljelykierrosta lisäsi etenkin *F. graminearum* ja *F. langsethiaen* tartuntaa ja oli ainoa merkitsevä viljelytekniinen tekijä, joka lisäsi DON- ja HT-2 –toksiinien pitoisuuksia viljoissa. Erityisesti *F. graminearum* tartuntaa lisäsivät mineraalilannoitteiden ja herbisidien käyttö sekä hiekkamaat kasvupaikkana.

3.4 Resistenssi punahometta vastaan

Resistenssi punahometta vastaan on monen tekijän summa. Yleisesti ottaen resistenssi voidaan jakaa aktiiviseen ja passiiviseen resistenssiin (Mesterhazy 1995). Aktiivinen resistenssi sisältää viisi resistenssin tyyppiä: Tyyppi I, resistenssi infektion alkamiselle (Schroeder ja Christensen 1963); tyyppi II, resistenssi infektion leviämisen kasvin solukossa (Schroeder ja Christensen 1963); tyyppi III, resistenssi jyvän infektoitumiselle (Mesterhazy 1995); tyyppi IV, toleranssi taudille (Mesterhazy 1995) ja tyyppi V, resistenssi toksiinien muodostumiselle (Mesterhazy 1995). Passiivista resistenssiä aiheuttavat kasvin pituus, vihneisyys ja tähkän tiiviys. Esimerkiksi pitkät ja vihneettömät vehnägenotyypit ovat kestävämpiä punahometartuntaa vastaan, kuin lyhyet ja vihneelliset (Mesterhazy 1995). Kauran tapauksessa pitkät kukkaperät ja löyhä röyhy antavat sille hyvän passiivisen resistenssin (Langevin ym. 2004; Tekle 2012). Aktiivisen resistenssin komponentit ovat oligo- tai polygeenisia eikä kaikkia resistenssikomponentteja täysin tunneta (Mesterhazy 1995). Esimerkkinä tyypin II resistenssistä, Miller ym. (1985) totesivat, että *Fusarium*-infektion seurauksena alttiissa vehnä- ja ruislajikkeissa esiintyi runsaammin sienibiomassaa kuin kestävässä, mikä viittaa siihen, että alttiit eivät pysty yhtä hyvin vastustamaan sienien leviämistä. Kestävillä vehnä- ja ruislajikkeilla esiintyi myös suhteessa vähemmän DON-toksiinia alttiisiin verrattuna, kun sienibiomassaa esiintyi huomattava määrä, mikä viittaa tyypin V resistenssiin eli kestävien lajikkeiden kykyyn ehkäistä DON-toksiinin synteesiä tartunnan saatuaan (Miller ym 1985). Tekle ym. (2018) ovat vastaavasti todenneet kauralla kestävien lajikkeiden sisältävän punahometartunnan seurauksena vähemmän DON-toksiinia, kuin alttiit lajikkeet. Punahomeristenssiä määrittävät useat kvantitatiivisia ominaisuuksia koodaavat lokukset (QTL), jotka liittyvät muun muassa genotyypin aikaisuuteen (Bjørnstad ym. 2017). Kestävyyttä määrittävät lokukset vaikuttavat ainakin DON-pitoisuuteen punahometartunnan seurauksena ja punahomeinfektion

ankaruuteen ja nämä lokukset voivat esiintyä myös muun muassa toisiinsa linkittyneinä (He ym. 2013). Tutkimuksissa on pyritty selvittämään SNP-geenimerkkien (Single Nucleotide Polymorphism) linkittymistä kestävyteen vaikuttaviin lokuksiin.

Loskutov ym. (2017) totesivat, että *Fusariumin* aiheuttaman jyväinfektion määrään vaikuttavia tekijöitä ovat röyhyn pituus, jyvälukumäärä, kestävyys lakoontumista ja lehtilaikkutauteja vastaan sekä ajanjakson pituus röyhyn esiintulosta tuleentumiseen. Genotyypit, joilla on pitkä röyhy, suuri jyvälukumäärä röyhyä kohti, heikko resistenssi lakoontumista ja lehtilaikkutauteja vastaan ja joilla tuleentuminen kestää pitkään, esiintyi merkittävässä määrin punahometartuntaa jyvissä. Loskutov ym. (2017) päätyivät myös tulokseen, jonka mukaan kuorettomat genotyypit ovat yleisesti ottaen kestävämpiä punahometta vastaan kuin kuorelliset. Lisäksi maatiaislajikkeet, jotka omaavat muodoltaan kompaktin röyhyn ja väriltään tummat kaleet, ovat kestävämpiä, kuin uudemmat jalostetut lajikkeet.

DON-toksiinin pitoisuuden ja eri genotyyppien ominaisuuksien väliltä on mahdollista löytää punahomekestävyyteen vaikuttavia tekijöitä. Tekle ym. (2018) mukaan DON-toksiinin pitoisuus korreloi negatiivisesti kasvin pituuden kanssa ja positiivisesti kukinnan aikaisuuden kanssa. Havaintojen perusteella siis pidemmissä kasveissa esiintyi lyhyitä vähemmän DON-toksiinia. Lisäksi mitä myöhemmässä vaiheessa kasvukautta genotyyppi kukki, sitä enemmän siinä esiintyi DON-toksiinia. Edellä mainitut ominaisuudet ilmentävät passiivista resistenssiä, sillä punahometartunta ei vaikuta kasvin pituuteen tai aikaisuuteen. Erilaisia lajikkeita tarkastellessaan Tekle ym. (2018) huomasivat, että alhaisimmat DON-pitoisuudet esiintyivät eräillä kuorettomilla lajikkeilla ja että lajikkeilla Odal ja Ringsaker DON-pitoisuudet olivat merkittävästi alhaisemmat kuin Suomessakin viljellyimpiin lajikkeisiin kuuluvalla Belindalla. DON-pitoisuudet Belindassa olivat suhteellisen korkeita, mutta itävyys sillä säilyi kontaminaatiosta huolimatta hyvänä.

3.5 Kauran punahomeresistenssijalostuksen tila

Punahomeresistenssiin liittyvä tutkimus kauralla on yleisesti ottaen ollut vähäisempää verrattuna vehnään ja ohraan (Tekle ym. 2018). Norjassa punahomeresistenssiä on arvioitu menetelmällä, jossa infektoituihin jyviin perustuva tartuke levitetään

kasvustoon ja kosteutta siellä pidetään infektion kehittymisen kannalta suotuisana ajastettujen sumutuskastelujen avulla. Resistenssin etsimiseksi ja siihen liittyvien ominaisuuksien tarkastelemiseksi on havainnointu kauragenotyyppien aikaisuutta, pituutta, taudin oireita pellolla sekä määritetty sadonkorjuun jälkeen DON-toksiinin pitoisuus ja itävyys. Etenkin DON-pitoisuus ja itävyys ovat suuria, joita on käytetty kestävyiden kriteerinä ja valintaperusteena resistenssijalostuksessa (Bjørnstad ja Skinnnes 2008; Tekle ym. 2018). Sumutuskasteluun yhdistetyn peltotartutusmenetelmän on todettu olevan toimiva menetelmä resistenssijalostuksessa. Menetelmä muistuttaa luonnollista tartuntaa, itiöt vapautuvat tartukkeesta pitkän ajan kuluessa, mikä on hyvä asia pitkään kukkivan kauran tapauksessa, ja menetelmän avulla voidaan tarkastella sekä aktiivista että passiivista resistenssiä (Tekle ym. 2018). Luonnolliseen tartuntaan pohjautuva resistenssin arviointi on epäluotettavaa, sillä tartunnan taso vaihtelee vuosittain olosuhteiden mukaan. Luonnollinen tartunta on usein liian vähäistä, jotta luotettava arvio genotyyppien välisistä kestävyyseroista olisi mahdollista saavuttaa (Tekle ym. 2018).

Resistenssijalostuksen suurimmat haasteet liittyvät kvantitatiivisen kestävyiden tuomiseen ja säilyttämiseen jalostusaineistossa. Kvantitatiivinen kestävyys ilmenee voimakkaasti olosuhteista riippuen. Tällä hetkellä sekä kestävyiden seurantaan, että sen tuomiseen tarvitaan paljon toistoja peltokokeissa ja paljon kalliita analyysejä, kuten itävyys- ja DON-analyysejä. Erilaisten kestävyiden liittyvien suureiden luotettavuus riippuu paljon koemallista, olosuhteista ja vuosien välisestä olosuhteiden vaihtelusta. Pellolla tehtävät silmämääräiset arviot punahometartunnan ankaruudesta eri genotyypeissä ovat epäluotettavia eivätkä aina korreloi DON-analyyssien tulosten kanssa (Tekle ym. 2018). DON-pitoisuuden ja itävyyden välinen negatiivinen korrelaatiokaan ei aina toteudu erilaisista vuosien välisistä olosuhteiden ja tartunnan runsauden vaihteluista johtuen. Lisäksi agronomisten ominaisuuksien, kuten kasvin pituuden ja genotyypin aikaisuuden, ja DON-pitoisuuden tai itävyyden väliltä löydetty yhteydet ovat ristiriitaisia eri tutkimusten välillä (Tekle ym. 2018). On siis hyvin tunnettava, milloin mitään kestävyiden liittyvää suuretta voidaan luotettavasti käyttää jalostusvalinnan perusteena. Kaikesta tästä seuraa, että uusille fenotyyppausmenetelmille on tulevaisuudessa tarvetta.

4 KASVIEN KUVANTAMISMENETELMÄT

4.1 Klorofyllifluoresenssikuvauus

Tarkastelemalla kasvin klorofyllifluoresenssia havainnoidaan fotosynteesikoneistossa toimivan fotosysteemi II:n aktiivisuutta (Murchie ja Lawson 2013). Fluoresenssikuvaukseen tarkoitetuilla laitteistoilla voidaan tutkia useita kasvin fotosynteettistä toimintaa kuvaavia suureita (Humplik ym. 2015). Fotosysteemi II:n aktiivisuutta kuvaavat suureet toimivat herkkinä indikaattoreina bioottisesta ja abioottisesta stressistä (PSI 2016). Kasvi voi käyttää klorofyllin absorboimaa Auringon valoenergiaa fotosynteesiin tai emittoida sitä lämpösäteilynä tai fluoresenssina. Nämä tavat purkaa viritysentergiaa ovat keskenään kilpailevia, jolloin yhden lisääntyessä toinen vähenee. Havaitut muutokset fluoresenssissa ilmentävät siten muutoksia kasvin fotosynteettisessä tilassa. Kun auringonvalon aiheuttama viritysentergia puretaan lämpönä, on kyse ei-valokemiallisesta vaimenemisesta (non-photochemical quenching) ja kun sitä muutetaan kemialliseksi energiaksi, puhutaan valokemiallisesta vaimenemisesta (photochemical quenching) (Sarvikas ym. 2017).

Klorofyllifluoresenssia havainnoitaessa, kasvi sopeutetaan ensin pimeään vähintään 20 minuutin aikana, jolloin fluoresenssi asettuu nollatasolle (Murchie ja Lawson 2013). Tämän jälkeen mitataan minimifluoresenssi F_0 mittausvalon avulla. Mittausvalo on liian heikkoa saadakseen aikaan fotosynteesiä, mutta riittävää tuottamaan fluoresenssin minimitason. Maksimifluoresenssi F_M saadaan aikaan saturaatiopulssilla, jossa valon intensiteetti on vähintään $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Maksimi- ja minimifluoresenssin erotuksena saadaan vaihteleva fluoresenssi F_V . Vaihtelevan fluoresenssin ja maksimifluoresenssin osamäärä (F_V/F_M) kuvaa fotosysteemi II:n suurinta fotokemiallista tehokkuutta (Murchie ja Lawson 2013). Sen avulla on nähtävissä ero esimerkiksi terveen ja kasvitaudin infektoiman solukon välillä, sillä osamäärän lasku osoittaa kasvin solukossa ilmenevää stressiä (Murchie ja Lawson 2013; Rousseau ym. 2013). Terveissä ja stressittömissä kasvisolukoissa F_V/F_M -arvo on optimiolosuhteissa tyypillisesti noin 0,83 (Murchie ja Lawson 2013). Fluoresenssin vakaata tilaa voidaan tarkastella, kun kasvin solukkoa valaistaan yhtäjaksoisesti aktiinisella valolla, jonka intensiteetti on enintään $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Aktiinisen valon vaikutuksessa fluoresenssi lisääntyy ensin

voimakkaasti, minkä jälkeen joidenkin minuuttien kuluttua fluoresenssi asettuu vakaalle tasolle. Tällöin voidaan saturaatiopulssien avulla edelleen määrittää maksimifluoresenssi valoon sopeutuneessa solukossa (F_M).

4.2 RGB-kuvaus

RGB-kuvaus viittaa perinteisiin värivalokuvaan perustuvaan kuvausmenetelmään. RGB-analyysi perustuu kuvattavan kohteen spektrin tarkasteluun kolmella eri näkyvän valon aallonpituusalueella, punaisella (**Red**), vihreällä (**Green**) ja sinisellä (**Blue**) (Keinänen 2017a). RGB-kuvista voidaan havaita muutoksia paitsi kasvien värissä myös muodossa ja toiminnassa. Niiden perusteella voidaan tarkastella esimerkiksi lehtiin ilmaantuvia laikkuja, stressitekijöiden aiheuttamia värimuutoksia ja kasvin nuutumista. RGB-kuvien perusteella voidaan tarkastella myös kasvin alaa, tilavuutta, biomassan määrää, muita morfologiaan liittyviä suureita sekä fenologiaa. Myös kasvin vanheneminen, suhteellinen lehtivihreäpitoisuus, siemensato ja muut agronomiset ominaisuudet ovat RGB-kuvista analysoitavissa (Keinänen 2017a).

RGB-kuvista kyetään analysoimaan kasvin kehitysvaiheiden tai stressitekijöiden valossa tapahtuvia muutoksia kasvin morfologiassa ja väriyksessä ilman, että kasvia tarvitsee vahingoittaa tai sen kehitystä häiritä (PSI 2016). Kasvien morfologiaa voidaan analysoida eri suunnista otettujen kuvien pohjalta laskettujen suureiden avulla. Tällaisia morfologisia ominaisuuksia voivat olla muun muassa kokonaislehtiala, pyöreys, ympärysmitta, peittävyys, halkaisija ja eksentrisyys (Furbank ja Tester 2011). Analyysi kuvien perusteella on mahdollista, kun kasvin kehityksestä tai jonkin ominaisuuden suhteen tapahtuvasta muutoksesta on koostettu aikasarja (Berger ym. 2012). Kuva-analyysin keinoin voidaan tarkastella kasvin reaktioiden ja stressitekijöiden välistä yhteyttä (Furbank ja Tester 2011). Kuvista voidaan seurata bioottisten stressitekijöiden aiheuttamien vaurioiden ja kloroottisten alueiden määrää, jolloin värianalyysi antaa käsityksen esimerkiksi kasvitaudin aiheuttaman infektion etenemisestä (Furbank ja Tester 2011). RGB-kuvaus on nopea ja tarkka menetelmä kasvin alan ja muiden morfologisten suureiden määrittelyssä (Humplik ym. 2015). Kun kasveja kuvataan useammasta suunnasta, voidaan aineiston käsittelyn avulla välttää lehtien asennosta ja liikkeistä johtuvia virhetekijöitä. Lisäksi digitaaliset kuvat ja niitä hyödyksi käyttävät

analyysimenetelmät vähentävät havainnoijan objektiivisuudesta johtuvia virheitä verrattuna ihmissilmin tehtävään havainnointiin (Green ym. 2012).

4.3 Hyperspektrikuvaus

Hyperspektrikuvauksessa tarkastellaan kuvattavan kohteen heijastamaa sähkömagneettista säteilyä, jonka spektriä kyetään kuvaamaan hyvin tarkasti (Humplik ym. 2015). Hyperspektrikamera havaitsee kamerasta riippuen kymmenistä satoihin eri aallonpituusalueita erillään ja myös näkyvän valon ulkopuolisia aallonpituusalueita, siinä missä tavallinen RGB-kamera havaitsee ainoastaan kolme aallonpituusaluetta näkyvän valon alueella (Keinänen 2017a). Jokainen molekyyli ja yhdiste absorboi ja edelleen heijastaa sähkömagneettista säteilyä omalla tavallaan, jolloin niille muodostuu omanlaisensa spektri. Kuvattavan kohteen spektrin perusteella voidaan siten selvittää sen kemiallinen koostumus (Humplik ym. 2015).

Hyperspektrikuvista voidaan tarkastella kohteen jokaisen pikselin koko spektriä (Humplik ym. 2015). Kun tarkastellaan esimerkiksi lähi-infrapuna-alueen (NIR) spektriä, voidaan kohteesta nähdä muun muassa proteiinien, lipidien, nukleiinihappojen ja polysakkaridien pitoisuuksia. Kuitenkin NIR-aallonpituusalueen spektri on monimutkainen ja vaikeaselkoinen analysoitavaksi, eivätkä muutokset spektrissä aina kerro tutkittavan ominaisuuden muutoksista (Keinänen 2017b). Kun puolestaan tarkastellaan lyhytaaltoisen infrapunasäteilyn aallonpituusaluetta (SWIR), voidaan määritellä kasvin vesipitoisuutta (Humplik ym. 2015). Kootun aikasarjan perusteella hyperspektridatasta voidaan havainnoida esimerkiksi kasveissa tapahtuvia muutoksia stressitekijän seurauksena. Hyperspektrikuvantamista hyödynnettäessä sopivan aallonpituusalueen valitseminen on tärkeää analyysin onnistumisen kannalta (Keinänen 2017b). Hyperspektridataa käsitellään matriisimuodossa, missä x- ja y-akseleilla kasvin lehti on kuvattuna kaksiulotteisesti ja z-akselilla ilmenee tieto kunkin alueen spektristä (Mahlein 2016).

Kasvin lehden optisiin ominaisuuksiin vaikuttavat sähkömagneettisen säteilyn siirtyminen lehden lävitse, lehdessä esiintyvät säteilyä absorboivat yhdisteet sekä säteilyn heijastuminen lehden pinnalta ja sisärakenteista (Mahlein 2016). Monet biofyysiset ja biokemialliset vuorovaikutukset, kuten lehden pigmenttipitoisuus,

vaikuttavat näkyvän valon heijastumiseen lehden pinnalta. Kasvin lehden spektri muuttuu, kun stressitekijä, esimerkiksi kasvitauti muuttaa lehden rakennetta ja kemiallista koostumusta. Kasvitaudin aikaansaamia spektrissä ilmeneviä muutoksia voivat olla esimerkiksi kloroottisen ja nekroottisen solukon kasvu ja sienitaudinaiheuttajan omien rakenteiden esiintyminen lehdessä. Myös taudinaiheuttajan elinkiertostrategia vaikuttaa muutoksiin lehden heijastaman säteilyn spektrissä. Biotrofit kasvitaudinaiheuttajat muuttavat suhteellisen vähän lehden rakennetta tai klorofyllikoostumusta, jolloin muutokset spektrissä johtuvat pääasiassa sienien omien rakenteiden kasvusta. Nekroottisia vaurioita aiheuttavat taudinaiheuttajat puolestaan saavat aikaan solukon hajoamista, jolloin kemiallinen koostumuskin muuttuu (Mahlein 2016).

4.4 Lämpökamerakuvaus

Lämpökamerakuvauksessa tarkastellaan kasvin heijastamaa infrapunasäteilyä aallonpituuksilla 8-12 μm ja jokainen lämpökamera-aineiston pikseli sisältää tiedon lämpötilasta (Mahlein 2016). Kasvin lehden lämpötila liittyy toisaalta ympäristötekijöihin, kuten ympäristön lämpötilaan, sademäärään ja tuulennopeuteen, mutta myös kasvipatogeenin infektiio saa aikaan muutoksia lehden lämpötilassa. Lehtilaikku- ja ruostesienet aiheuttavat paikallisia ja selkeästi määriteltäviä muutoksia, kun taas juuripatogeenit ja systeemiset infektiot, kuten *Fusariumin* aiheuttamat infektiot muuttavat haihduntaa koko kasvissa tai kasvinosassa (Mahlein 2016). Haihduttaminen viilentää kasvia, jolloin stressitekijän, esimerkiksi kasvitaudin aikaansaama ilmarakojen sulkeutuminen haihdunnan vähenemisen kautta nostaa lämpötilaa lehdessä. Kyseiset muutokset voidaan havaita lämpökamera-aineistosta (Humplik ym. 2015).

Haihdutuksen muutosten visualisointi onkin lämpökamerakuvauskeskeinen sovellutus (Chaerle ym. 2004). Keskilämpötilan ero lehtien, kasvien tai kasvinosien välillä on kasvitauti-infektion etenemisen tärkeä indikaattori (Mahlein 2016). Lämpökamerakuvausta voidaan haihdunnan muutosten ohella hyödyntää myös lehden vesipitoisuuden ja kasvin vesitasapainon havainnollistamisessa. Lämpökamerakuvaus voi tulevaisuudessa myös tehostaa kasvinjalostusta nopeuttamalla kasvin vedenkäytön tehokkuuden suhteen tehtävää valintaa (Chaerle ja Van Der Straeten 2000).

4.5 Fenotyyppaustekniikoiden käyttö kasvipatologisessa tutkimuksessa

Edellä esitellyt menetelmät ja tekniikat tehostavat kasvien fenotyyppausta silmämääräisesti tehtävään havainnointiin verrattuna ja poistavat ihmisen objektiivisuudesta johtuvia virheitä. Näiden tekniikoiden avulla voidaan muodostaa havaintoaineistosta aikasarjoja, joissa havaintojen tiheys voidaan määritellä tarpeen mukaan mahdollistaen inhimillistä havainnointia tehokkaamman aineiston keruun. Tällöin myös aineiston analysointi on mahdollista toistaa useita kertoja esimerkiksi vuorokauden ajalta kerätyssä aineistossa. Aineistoa voidaan kerätä samanaikaisesti useilla eri sensoreilla, mikä antaa mahdollisuuden eri ilmiöiden tarkempaan vertailuun. Menetelmien kiistattomana etuna on myös se, että kasvimateriaalia ei tarvitse aineiston keruun yhteydessä tuhota tai vahingoittaa. Tekniikoiden avulla kasvitauti-infektion oireet on lisäksi usein mahdollista havaita jo ennen silminnähtävien oireiden ilmaantumista.

Fluoresenssikuvauksen avulla voidaan tarkastella esimerkiksi sieni-infektion etenemistä kasvin solukoissa ja miten infektion oireet ovat jakautuneet tarkasteltavissa kasvin osissa (Bauriegel ym. 2010). Taudinaiheuttajasienen elinkiertostrategia vaikuttaa siihen, minkälaisia muutoksia sieni aiheuttaa kasvin fotosynteesikoneiston toiminnassa (Scholes ja Rolfe 2009). Biotrofit taudinaiheuttajat vähentävät kohdesolukon fotosynteesin tasoa uudelleenohjelmoimalla isäntäkasvin aineenvaihduntaa siten, että elävät solukot alkavat tuottaa ravinteita sienelle. Nekrotrofit eli kasvisolukkoa tappavat taudinaiheuttajat vähentävät kohdesolukon fotosynteesiä hajottamalla soluseiniä ja tuottamalla toksiineita aiheuttaen lopulta solujen kuoleman. Fluoresenssikuvauksen ja –analyysin perusteella voidaan selvittää, miten vaihtelevaa esimerkiksi infektoituneen lehden fotosynteesi on lehden eri osissa. Chaerle ja Van Der Straetenin (2000) mukaan infektoitunut lehti voi sisältää taudinaiheuttajan asuttamaa solukkoa, oireista solukkoa, johon taudinaiheuttaja ei ole levinnyt sekä oireetonta solukkoa.

Bauriegel ym. (2010) tarkastelivat *Fusariumin* aiheuttaman punahometartunnan vaikutuksia fluoresenssiin vehnän tähkissä. Infektion vaikutus koko tähkän suurimpaan fotokemialliseen tehokkuuteen (F_v/F_m) oli pientä, mutta se lisäsi merkittävästi sen tilastollista jakaumaa. Kokeen olosuhteissa F_v/F_m –arvot terveissä kontrolleissa olivat keskimäärin 0,76. Tartutetuissa tähkissä infektion alkuvaiheessa infektion kattaessa

korkeintaan 3 prosenttia tähkästä, suurin osa, 99,87 prosenttia F_V/F_M -arvoista vaihteli vielä välillä 0,5–0,75. Vasta infektion edetessä jakauma laajentui. Fotosynteesi oli selvästi heikentynyt tartunnan kattaessa 20 prosenttia tähkästä. Kun tartunta kattoi puolet koko tähkästä välillä 0–0,2 vaihtelevat arvot olivat lisääntyneet huomattavasti aiheuttaen toisen piikin frekvenssikuvaajaan. Bauriegel ym. (2010) totesivat, että infektio aiheuttaa muutoksia ensin solukoiden fotosynteettiseen aktiivisuuteen ennen kuin fotosynteesikoneisto alkaa hajota. Vehnän kasvuasteella BBCH 75 terveet ja infektoituneet tähkylät pystyttiin fluoresenssikuvantamisen perusteella hyvin erottamaan toisistaan. Erot näiden välillä oli mahdollista havaita 5–6 päivän kuluttua tartutuksesta.

Tallada ym. (2011) tarkastelivat eri sienitaudinaiheuttajien infektoimia maissin jyviä käyttäen apuna lähi-infrapunaspektroskopiaa (NIRS) ja värivalokuvia. Kuva-aineiston perusteella pyrittiin erittelemään infektion eri kehitysvaiheita sekä tunnistamaan eri taudinaiheuttajia. NIRS:n avulla pystyttiin tartuttamattomista kontrollijyvistä luotettavasti erottamaan parhaimmillaan tietyssä infektion kehitysvaiheessa 98 prosenttia ja värivalokuvien perusteella vastaavasti 89 prosenttia, käytettäessä lineaarista erotteluanalyysiä (LDA). Tarkasteltaessa kaikkia infektion kehitysvaiheita NIRS:llä kyettiin erottamaan 89 prosenttia kontrollijyvistä ja 79 prosenttia tartutetuista, kun vastaavasti värivalokuvista kummistakin kyettiin erottamaan 75 prosenttia. Kummankin kuvausmenetelmän tapauksessa tunnistamisen tarkkuus lisääntyi infektion edetessä, verrattuna varhaisiin vaiheisiin. Värivalokuvien tapauksessa rajoitteen analyysin tarkkuudelle asettaa NIR:iä kapeampi sähkömagneettisen säteilyn aallonpituusalue (Tallada ym. 2011). Vastaavaa infektoituneiden ja terveiden kasvinosien erottelua RGB-kuvien perusteella on sovellettu myös muun muassa taateleilla (*Phoenix dactylifera* L.) (Teena ym. 2016).

RGB-kuviin perustuvan digitaalisen fenotyypausmenetelmän soveltuvuutta kasvipatologiseen tutkimukseen on selvitetty maissin taudinkestävyyden tarkastelussa (Green ym. 2012). Maissin taudinkestävyyttä tarkasteltiin kasvin tummumisen, kloroottisten laikujen ja nekroottisten vaurioiden perusteella soveltaen fenotyypaukseen kehitettyä RGB-kuviin perustuvaa PhenoPhyte-sovellusta. PhenoPhyte on kuvadatan käsittelyyn kehitetty sovellus, jonka kehitystyön yhteydessä

on luotu menetelmiä varsinaiseen kasvien fenotyyppaukseen. Kokeessa sienitaudinaiheuttajalla tartuttujen maissiyksilöiden ylimpiä lehtiä kuvattiin peltoolosuhteissa. Ylimmät lehdet valittiin kuvattavaksi, koska niiden havainnointi tiedettiin keskeiseksi resistenssin tunnistamisen kannalta. Kuvien perusteella maissin lehdistä laskettiin automaattisen kuvankäsittelyn yhteydessä PhenoPhyte-sovelluksella taudin ankaruus määrittelemällä nekroottisten vaurioiden osuus lehdistä (Green ym. 2012).

Diaz-Lago ym. (2003) tarkastelivat kauran kestävyyttä rengasruostetta vastaan hyödyntäen digitaalisiin valokuviiin perustuvaa analyysiä. He analysoivat kolmen kauragenotyypin lehdistä taudinaiheuttajan kesäitiöpesäkkeiden tiheyttä, kokoa, suhteellista infektion runsautta, taudin itämisaikaa, ruostelaikkujen ilmaantumisaikaa sekä taudin kehitysastetta kuvista koostetusta aikasarjasta. Analyysin perusteella havaittiin, että kestävillä kauragenotyypeillä kesäitiöpesäkkeet olivat pienempiä, niitä esiintyi vähemmän ja ne ilmaantuivat myöhemmin kuin alttiilla kontrollilla. Diaz-Lago ym. (2003) totesivat, että käyttämänsä menetelmän avulla kyetään tuottamaan tarkkoja arvioita osittaisen taudinkestävyuden tekijöistä ja taudin kehitystasesta.

RGB-kuviin perustuvia fenotyyppausmenetelmiä on kokeiltu käytännössä kasvipatologisen tutkimuksen lisäksi myös muun muassa biomassan ja abioottisten stressitekijöiden tarkastelussa. Lituruohon (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) tapauksessa RGB-kuvien pohjalta lasketulla kasvin pinta-alalla oli selkeä korrelaatio kasvin tuore- ja kuivapainon kanssa (Humplik ym. 2015). Myös ohran ja vehnän biomassan laskennassa eri suolapitoisuuksissa on löydetty keino päästä tarkkaan tulokseen RGB-kuvien pohjalta tehdyn analyysin avulla (Golzarian ym. 2011).

Spektroskopiaa on sovellettu kauran punahomeresistenssin tutkimiseen nopeana vaihtoehtona kalliille kemiallisille DON-analyysille (Tekle ym. 2013b). Tekle ym. (2013b) tarkastelivat DON-toksiinia sisältäviä kauran jyviä näkyvän valon ja lähi-infrapunavalon välisillä aallonpituuksilla. Sen lisäksi, että he havaitsivat paljon DON-toksiinia sisältäneiden näytteiden olevan väriltään tummempia ja pintarakenteeltaan karkeampia, he havaitsivat myös vesi- ja rasvapitoisuuden olevan niissä pienempiä vähän DON-toksiinia sisältäneisiin näytteisiin verrattuna. He myös totesivat, että spektroskopiaa edellä mainitulla aallonpituusalueella voidaan hyödyntää punahomeresistenssiltään heikoimpien kauragenotyyppien karsimiseen. NIR-

hyperspektrikuvauksella on myös kyetty erottamaan punahomeen infektoimia kauranäytteitä terveistä ja oireettomista näytteistä (Tekle ym. 2015). Tekle ym. (2015) osoittivat, että infektoituneiden näytteiden spektrin intensiteetti oli korkea aallonpituuksilla 1,925; 2,070 ja 2,140 nm, kun taas terveissä näytteissä korostuivat lyhyemmät aallonpituudet 1,400; 1,626 ja 1,850 nm.

Bauriegel ym. (2010) luokittelivat hyperspektrikuvauksen keinoin terveitä ja *Fusariumin* aiheuttaman punahometartunnan saastuttamia vehnän tähkiä. Spektrin analysointi 400-1000 nm aallonpituusalueella mahdollistaa punahometartunnan tunnistamisen vehnän tähkistä. Tutkimuksen hyperspektriaineistoa analysoitiin pääkomponenttianalyysillä (PCA), missä tarkasteltiin infektoitujen ja terveiden kasvinosien eroja neljällä eri aallonpituusalueella. Punahomeinfektion tunnistaminen luotettavasti oli mahdollista BBCH-asteikon kasvuasteilla 71–85. Paras vaihe infektion tunnistamiseen oli maitotuleentumisen keskivaiheilla, kasvuasteella BBCH 75. Juuri kukinnan alun jälkeen kasvuasteella BBCH 65 infektion tunnistaminen PCA-analyysissä oli mahdotonta oireiden puuttumisesta johtuen ja täystuleentuneesta tähkästä kasvuasteella BBCH 89 tämä ei ollut mahdollista myös terveissä tähkissä tapahtuvan klorofyllin hajoamisen vuoksi. Bauriegel ym. (2010) käyttivät luokittelussa myös punahomeindeksiä (HBI), jossa spektrin eroja tarkastellaan vain kahdella aallonpituusalueella, 550-560 ja 665-675 nm. Menetelmän todettiin olevan mahdollisesti pelto-olosuhteisiin sopiva keino tunnistaa punahomeinfektio.

Kirjallisuudesta löytyy myös muita esimerkkejä hyperspektrikuvauksen soveltamisesta kasvintuhoojan oireiden tunnistamiseen. Singh ym. (2007) tarkastelivat varastosienten infektoimia vehnän jyviä ja kykenivät helposti erottelemaan infektoituneet jyvät terveistä NIR-hyperspektrikuvauksen avulla tarkastellen aallonpituusaluetta 1000-1600 nm. Dumont ym. (2015) puolestaan kykenivät jaottelemaan hyperspektrikuvauksen avulla kuusen (*Picea abies* (L.) H. Karst.) siemenet elinkelpoisiin, tyhjiin ja kasvintuhoojan infektoimiin yli 90 prosentin tarkkuudella. Kaikki jaottelun kannalta tärkeät ominaisuudet sijaitsivat spektrin lyhytaaltoisen infrapunasäteilyn taajuusalueella. Bravo ym. (2003) tutkivat säteilyn heijastumista terveistä ja keltaruosteen (*Puccinia striiformis* Westend.) saastuttamista vehnistä. He havaitsivat, että keltaruosteen infektoimilla kasveilla näkyvän valon heijastavuus on suurempaa kuin terveillä johtuen

alhaisemmasta klorofyllin aktiivisuudesta, kun taas lähi-infrapunan aallonpituusalueella absorptio on suurempaa lehden sisäisten rakenteiden hajoamisesta johtuen.

Lämpökamerakuvausta on hyödynnetty kasvitautilien etenemisen seurannassa. Esimerkiksi lehtihomeen (*Pseudoperonospora cubensis* Berk & Curt.) infektion sekä ympäristöolosuhteiden vaikutuksia kurkun (*Cucumis sativus* L.) lehdissä on havainnoitu lämpökamerakuvauksella (Oerke ym. 2006). Lehtien lämpötilaerojen muutosten ja kasvitaudin ankaruuden todettiin liittyvän toisiinsa. Kasvitaudin etenemisen aiheuttamat muutokset kasvin metaboliassa vaikuttivat haihduttamiseen, joka korreloi negatiivisesti lehden lämpötilan kanssa. Kloroottisen ja nekroottisen solukon kasvu johti odotettavissa oleviin muutoksiin lämpötilassa. Lämpökameradatan perusteella terveet ja infektoituneet alueet kyettiin erottamaan ennen lehtihomeen näkyvien oireiden ilmestymistä. Ympäristön olosuhteet, kuten ilman lämpötila ja kosteus vaikuttivat kuitenkin lehden pinnan lämpötilaan, joten suurimman lämpötilaeron käyttäminen yksinään kuvaamaan infektion tasoa pelto-olosuhteissa ei ole tarkoitukseen soveltuvaa (Oerke ym. 2006).

Kasvitaudin oireita on todettu voitavan havaita varhaisessa vaiheessa ennen silminnähtävien oireiden ilmaantumista myös tupakalla (Chaerle ym. 2004). Ensimmäisenä oireena vastustuskykyisessä tupakan (*Nicotiana* sp.) mosaiikkiviruksen (*Tobacco mosaic virus*) infektoimassa kasvissa lämpökameradatasta havaittiin paikallinen lehden lämpötilan nousu kahdeksan tuntia ennen näkyvän nekroottisen alueen ilmaantumista. Lämpökamerakuvauksen mahdollisuus havaita oireita varhaisessa vaiheessa voikin tarjota uusia näkökulmia kasvitautiliresistenssin tunnistamiseen genotyyppiaineistosta (Chaerle ym. 2004).

5 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tutkimuksen tavoitteena on kehittää menetelmät kauran ja kauran punahomeilla tartutettujen tähkylöiden kuvantamiseen perustuvaan fenotyyppaukseen kansallisessa kasvien fenotyyppausinfrastruktuurissa (NaPPI). Kehitetyillä menetelmillä pyritään lisäksi erottamaan kukissa esiintyvälle *Fusarium*-sienten aiheuttamalle infektiolle vastustuskykyisiä kauralajikkeita, seuraamaan kasvien kasvua ja morfologiaa sekä punahometartunnan etenemistä ja tutkimaan punahomeresistenssiin vaikuttavia

tekijöitä. Tutkimuksen tavoitteiden saavuttamiseksi toteutetaan Viikin kasvihuoneilla kolme erillistä koetta: 1) Kauran kasvun ja morfologian seurantakoe, 2) kasvatusalustojen vertailukoe ja 3) varsinainen lajikevertailukoe punahomeen pistetartutuksilla. Näistä kaksi ensimmäistä toimivat pohjustavina kokeina varsinaista lajikevertailukoetta varten.

Hypoteesina kauran kasvun ja morfologian seurantakokeessa genotyyppien väliltä oletetaan löytyvän eri tavoin seurannan eri vaiheissa ilmeneviä morfologisia eroja, jotka voidaan havaita kuva-aineistosta ja jotka ilmentävät genotyyppien erilaista kasvutapaa ja kehitysrytmiä. Kasvatusalustojen vertailukokeessa oletetaan löydettävän joitakin tuloksiin vaikuttavia eroja testattavien kasvatusalustojen väliltä niiden kyvyssä ylläpitää kauran tähkylöiden elinvoimaisuutta tai mahdollistaa punahomeinfektion etenemistä. Hypoteesina lajikevertailukokeessa on, että fluoresenssissa havaittavien muutosten avulla voidaan tunnistaa punahomeinfektio kauran tähkylöissä, seurata punahomeinfektion etenemistä ja löytää genotyyppien väliltä eroja infektion etenemisnopeudessa.

6 AINEISTO JA MENETELMÄT

6.1 Kasvimateriaali

Seitsemän kauragenotyyppiä: Akseli, Belinda, Odal, VIR 14720, VIR 7766, Steinar ja Sofiina valittiin lajikevertailuun sekä kasvun ja morfologian seurantaan. Lajikkeiden ja linjojen valintaperusteena käytettiin kirjallisuuden ja Luonnonvarakeskuksen (Luke) kenttäkokeissa tehtyjen havaintojen perusteella saatua tietoa niiden kestävydestä *Fusariumin* aiheuttamaa punahometartuntaa vastaan. Akseli on Boreal Kasvinjalostus Oy:n jalostama lajike, joka on jalostuslinjassa Belindan jälkeläinen. Norjassa sen kestävyys punahometartuntaa vastaan on arvioitu hieman Odalia heikommaksi (Tekle ym. 2018). Luken kokeissa tehtyjen havaintojen perusteella Akseli on kestävyydeltään keskivertoa parempi ja peltoviljelyssä siinä havaitaan harvoin korkeita mykotoksiinipitoisuuksia. Belinda on ruotsalaisen Lantmännen SW Seed:n jalostama lajike, joka on kestävyydeltään Akselia ja Odalia heikompi (Tekle ym. 2018). Tartunnan seurauksena Belindan itävyys voi säilyä kohtalaisena, mutta DON-toksiinin pitoisuus voi nousta korkeaksi. Luken kenttäkokeissa sen kestävyys on arvioitu keskimääräistä

paremmaksi ja kasvihuonekokeissa keskimääräiseksi. Odal on norjalaisen Graminorin jalostama Belindasta periytyvä lajike, jolla itävyys säilyy hyvänä ja DON-toksiinin pitoisuus alhaisena punahometartunnan jälkeen (Tekle ym. 2018). Odal on todettu keskimääräistä kestävämmäksi myös Luken kenttäkokeissa.

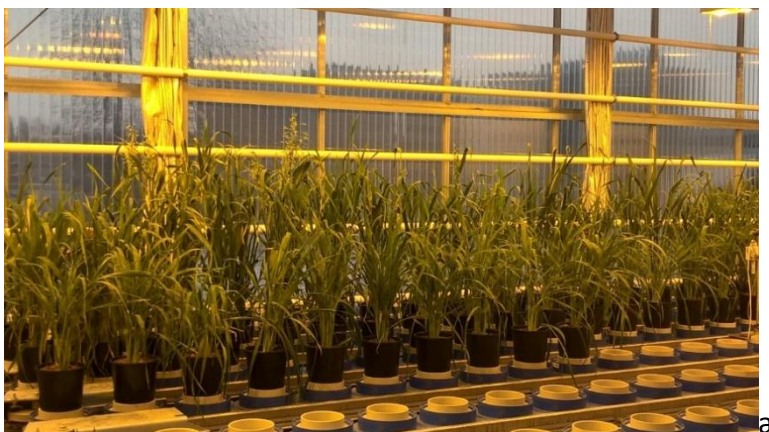
Linjat VIR 14720 ja VIR 7766 ovat venäläisen Vavilov-instituutin geenipankista peräisin olevia genotyyppejä. VIR 14720 on kuoreton maatiainen, joka on peräisin Valko-Venäjältä (VIR 2018). Kuorettomat genotyypit on todettu kuorellisia kestävämmiksi punahometartuntaa vastaan (Loskutov ym. 2017), ja myös Luken kokeissa on havaittu, että kuorettomissa genotyypeissä esiintyy tartunnan seurauksena toksineita kuorellisia vähemmän. VIR 7766 on kestäväksi todettu ruskeajyväinen maatiainen, joka on peräisin Kiinasta (Gagkaeva ym. 2013; VIR 2018). Steinar on Boreal Kasvinjalostus Oy:n jalostama lajike, joka on todettu Norjassa melko alttiiksi ja siitä mitattiin Lillemo ym. (2014) mukaan Norjassa viljelyksessä olevien, seitsemän vuoden aikana kahdella koepaikalla testattujen lajikkeiden korkeimpia DON-toksiinin pitoisuuksia. Luken kokeissa Steinarin itävyyden on todettu reagoivan herkästi punahometartuntaan. Luken aineiston perusteella Steinar on kuitenkin kestävydeltään keskimääräinen. Sofiina on Boreal Kasvinjalostus Oy:n jalostama lajike, joka on todettu Lukessa sekä kenttä- että kasvihuonekokeissa alttiiksi lajikkeeksi. Sofiina poistettiin Eviran kasvinjalostajanoikeusrekisteristä vuonna 2018 (Evara 2018), eikä sitä ole koskaan viety markkinoille. Vilja-alan yhteistyöryhmän julkaisemista kaupan ja teollisuuden vastaanottonäytteistä määritettyjen kauralajikkeiden DON-toksiinipitoisuuksien mediaaniluvuista nähdään, että Suomessa Akselin ja Belindan DON-mediaani vuosina 2014-2016 oli 0,25 mg/kg eli selvästi alle elintarvikeraja-arvon (VYR 2016). Myös Steinarin DON-mediaani oli sama vuosina 2014 ja 2015, mutta DON-toksiinin suhteen hankalana vuonna 2016, sen mediaaniluku 1,67 mg/kg lähestyi jo elintarvikeraja-arvoa.

6.2 Kauran kasvun ja morfologian seurantakoe

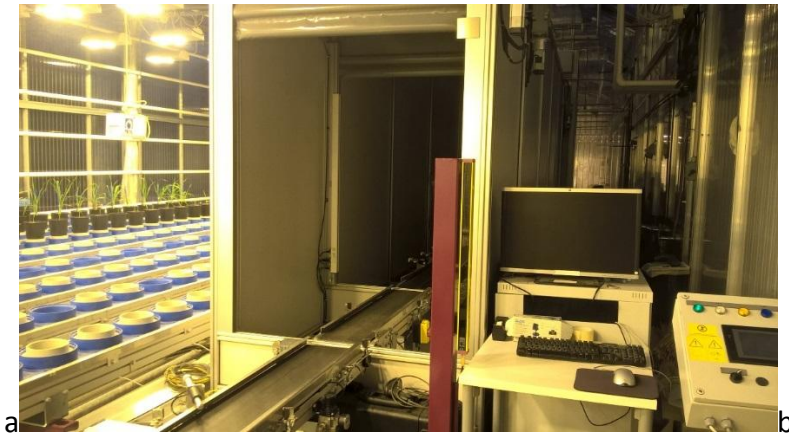
6.2.1 Koemateriaalin kasvatus

Kasvun ja morfologian seurantakokeessa valittujen kauragenotyyppien kasvutapaa ja kehitysrytmiä sekä erilaisia morfologisia ominaisuuksia havainnoitiin niiden kasvun ja kehityksen aikana hyödyntäen NaPPI:n suurten kasvien ympäristöä RGB-kameroineen.

Kokeessa analysoitiin genotyyppien välisiä eroja havainnoitujen ominaisuuksien suhteen sekä ominaisuuksien mahdollista yhteyttä punahomeresistenssiin. Kauralajikkeiden ja –linjojen seurantakoe toteutettiin marraskuun 2017 ja maaliskuun 2018 välisenä aikana. Koejäseniksi kauran kasvun ja morfologian seurantakoetta varten kasvatettiin jokaista seitsemää valittua kauragenotyyppiä Helsingissä Helsingin yliopiston Viikin kasvihuoneilla sijaitsevassa NaPPI:n suurten kasvien ympäristössä. Kasvatuksessa ja aineiston keruussa käytettiin Plant screen System For Large Plants –laitteistoa (Photon Systems Instruments, Tšekin tasavalta) (kuva 2). Kylvö suoritettiin kahdessa toistossa 20.11. ja 4.12.2017 ja molempiin toistoihin kylvettiin viisi kerrannetta jokaista koejäsentä, joista jokainen edusti kutakin genotyyppiä. Koejäsenet kylvettiin kolmen litran ruukkuihin yksitellen noin 2 cm:n syvyyteen. Kasvualustana käytettiin Kekkilän karkeaa ruukutusseosta (W R8014). Alkukasteluna jokaiselle ruukulle annettiin 1 litra vettä, minkä jälkeen kastelu tapahtui järjestelmässä automaattisesti referenssipainon perusteella yhdestä kahteen kertaa vuorokaudessa. Lannoitus suoritettiin kastelun yhteydessä Kekkilän Professional Superex-vihannes –valmisteella (NPK 9-5-31) 1–1,5 mS väkevyydellä. Kasvihuoneen tavoitelämpötilaksi säädettiin päivällä n. +19°C ja yöllä n. +13°C. Päivänpituudeksi asetettiin 18 tuntia. Säteilyrajaksi korkeapainenatriumvalojen sammumiselle asetettiin 200 W/m². Kaurojen kasvaessa pituutta, ne tuettiin kiinnittämällä teipillä tukikeppiin. Koejäsenten ja kerranteiden järjestys kasvihuoneessa satunnaistettiin eikä järjestystä muutettu kasvatuksen aikana.



a



Kuva 2. NaPPI:n suurten kasvien ympäristö. Kasvimateriaali röyhyn esiintulovaiheessa kasvatuslinjastolla (a) sekä Plant Screen System For Large Plants –laitteiston kuvauskammio ja työasema (b).

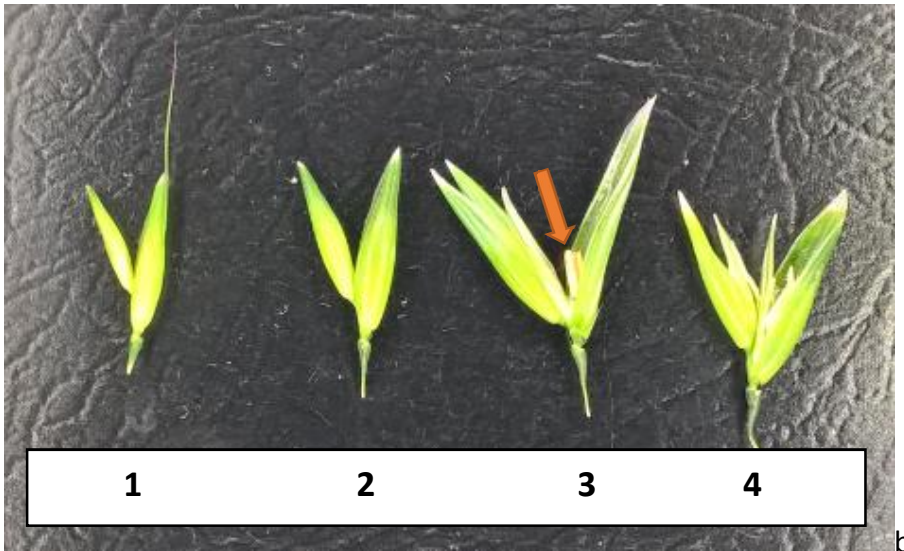
6.2.2 Kuva-aineiston keruu ja analysointi

Seurantakokeen kuva-aineiston keruu toteutettiin marraskuun 2017 ja helmikuun 2018 välisenä aikana. Koejäsenet kuvattiin Plant Screen System For Large Plants –laitteiston RGB-kameralla kahden vuorokauden välein kolmesta suunnasta sivulta (0° , 120° ja 240°). Ensimmäistä kylvöerää kuvattiin 28.11.2017–11.1.2018 ja toista kylvöerää 14.12.2017–12.2.2018. Morfologiset suureet mukaan lukien pituus, leveys, ympäröysmitta, tiiviys ja pinta-ala määritettiin Plant Screen Data Analyzer -ohjelmistolla (Photon Systems Instruments), josta aineisto tuotiin Excel-tiedostomuodossa. Genotyyppien aikaisuutta havainnoitiin silmämääräisesti röyhyn esiintuloa päivittäin seuraamalla. Tilastollisessa analyysissä käytettiin kaksisuuntaista varianssianalyysiä ja Tukeyn testiä, jotka suoritettiin SPSS-ohjelmistolla (versio 25, SPSS Inc., Chigaco, IL, USA). Analyysiä varten molempien kylvöerien aineistosta valittiin kaksi aikapistettä tarkasteltavaksi genotyyppien summittaisen röyhyn esiintulon perusteella. Ensimmäisen kylvöerän aikasarjasta tarkasteltiin aikapisteitä noin kahta viikkoa ennen röyhyn esiintuloa 28.12.2017 sekä röyhyn tullessa esiin 11.1.2018. Toisen kylvöerän aikasarjasta tarkasteltiin vastaavia aikapisteitä 23.1.2018 ja 6.2.2018. Tilastollisessa analyysissä testattiin genotyypin, kerranteen ja näiden yhteisvaikutuksen vaikutusta mitattuihin morfologisiin suureisiin. Parittaisessa vertailussa tarkasteltiin genotyyppien välillä esiintyviä tilastollisesti merkitseviä eroja.

6.3 Tartutusmenetelmä lajike- ja kasvatusalustojen vertailukokeissa

Ennen tartutusta kauran kukinnan alkuvaiheessa kasveista irrotettiin pian kukintansa aloittavia tähkylöitä (kuva 3), joita asetettiin halkaisijaltaan 9 cm:n petrimaljoille. Tähkylät pyrittiin keräämään sellaisten kasvien röyhyjen keskiosista, missä ylimmät tähkylät kukkivat esillä olevin hetein, kasvin BBCH-asteikon mukaisen kasvuasteen ollessa noin 61 (kuva 4). Kaikki tähkylät pyrittiin keräämään samassa kehitysvaiheessa olevista kasveista. Tähkylät irrotettiin kasvista siten, että tähkylän perään jätettiin hieman vartta sen kiinnittämiseksi kasvatusalustaan. Lisäksi ennen tähkylöiden asettamista maljoille, kaleet poistettiin. Tähkylöiden keräyksen jälkeen petrimaljat siirrettiin NaPPI:n pienten kasvien ympäristöön tartutettavaksi. Pienten kasvien ympäristö on suljettu kasvatushuone, jossa lämpötila ja suhteellinen ilmankosteus pyrittiin pitämään vakioina (lämpötila 22-23°C, suhteellinen ilmankosteus 60%). Tähkylöitä sisältävät petrimaljat pidettiin 18 tunnin valojaksossa kannet suljettuina.





Kuva 3. Eri kehitysvaiheissa olevia kauran tähkylöitä, vasemmalla kehitysvaiheessa nuorin ja oikealla vanhin tähkylä suoraan kasvusta leikattuna (a) sekä kaleet poistettuna ja valmiina asetettavaksi petrimaljalle (b). 1 = Tartutusta varten kerättäväksi liian pieni ja kehittymätön tähkylä, 2 = pian kukintansa aloittava tähkylä, joka sopii tartutusta varten kerättäväksi, 3 = kukintansa juuri aloittanut tartutettavaksi valmis tähkylä, jossa heteet osoitettu nuolella, 4 = tartutusta varten kerättäväksi liian pitkälle kehittynyt tähkylä.



Kuva 4. Tähkylät kerättiin tartutusta varten röyhyn keskivaiheilta pipetin kärjen osoittamasta kohdasta mahdollisuuksien mukaan samasta solmukohdasta tähkylöiden yhtenäisen kehitysvaiheen varmistamiseksi. Kuvassa röyhyn ylimmät tähkylät ovat aloittaneet kukinnan, vaikka heteitä ei näy kaleiden ulkopuolella.

Tartukkeena käytettiin Luken Jokioisten kaurakoekentältä vuonna 2005 eristettyä *F. graminearum* -isolaattia 05011. Syväjästä elvytetty viljelmä saatiin tuottamaan

kuromaitiöitä UV-valojen avulla Jokioisilla. Jokioisilta saaduista täyteen kasvaneista maljoista valmistettiin varsinainen nestemäinen tartuke uuttamalla muoviputkilossa (1 ml eppendorf-putki) veteen rikutusta sienen rihmastosta vapautuneita kuromaitiöitä. Kuromaitiöiden uuttoon käytettiin yhtä maljaa kohden 10–20 ml vettä ja yhteen tartukeannokseen käytettiin neljä sienirihmastoa täyteen kasvanutta maljaa. Sienen rakenne rikottiin Vortex-laitteella sienirihmaston ollessa liuotettuna milli Q –veteen. Liuoksesta tarkistettiin kuromaitiöiden pitoisuus mikroskoopin avulla ja liuos laimennettiin milli Q –vedellä siten, että kuromaitiöiden pitoisuus valmiissa tartukkeessa oli n. 50 000 itiötä/ml. Tartukkeeseen lisättiin lopuksi itiöiden sakkautumisen välttämiseksi polysorbaatti 80 –liuosta (Tween 80, Croda Americas Inc., Wilmington, DE, USA) 0,5 µl/ml. Kontrollissa käytettiin tartukkeena pelkää vettä, johon lisättiin vastaava määrä polysorbaatti 80 –liuosta. Nestemäistä tartuketta käytettiin kaikissa kokeissa korkeintaan vuorokausi valmistuksen jälkeen.

Lajike- ja kasvatusalustojen vertailukokeissa tähkylät tartutettiin pipetoimalla jokaisen tähkylän sisään ulko- ja sisähelpeen väliin 10 µl tartuketta (kuva 5). Tartukeputkiloa ravisteltiin säännöllisesti tartutuksen lomassa itiöiden sakkautumisen välttämiseksi. Käsien ja välineiden desinfioinnista huolehdittiin tartutuksen aikana erityisesti siirryttäessä sienitartutuksesta kontrolliin. Tartutuksen yhteydessä tähkylä irrotettiin kasvatusalustasta väliaikaisesti.



Kuva 5. Tartuke sijoitettiin tähkylän sisään ujuttamalla pipetin kärki ulko- ja sisähelpeen väliin.

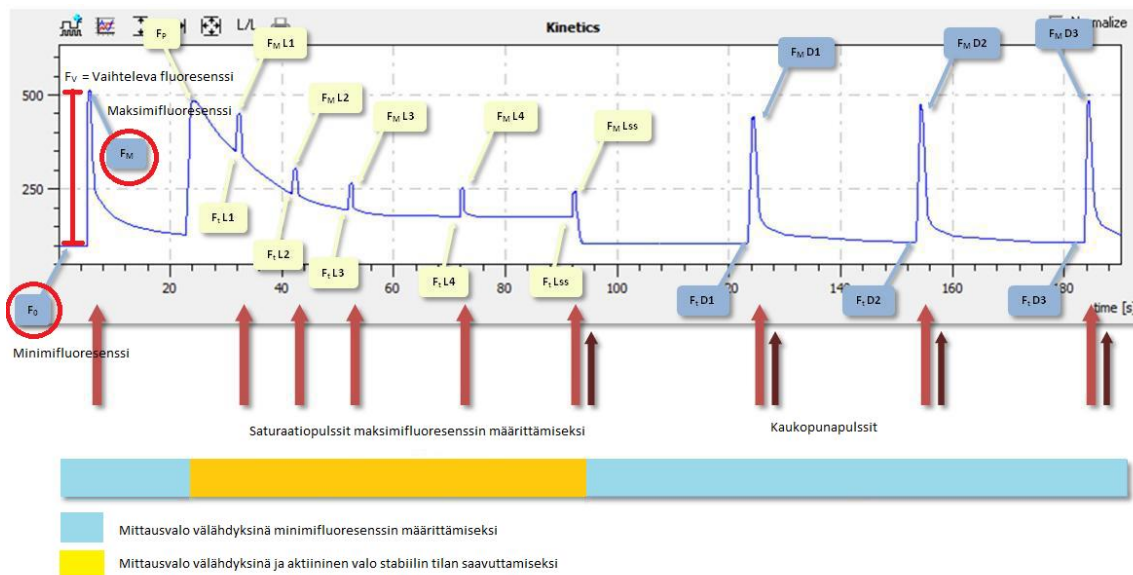
6.4 Fluoresenssiaineiston keruu ja analysointi lajike- ja kasvatusalustojen vertailukokeissa

Lajike- ja kasvatusalustojen vertailukokeita seurattiin tartutusten jälkeen Plant Screen Compact System –laitteistossa (Photon Systems Instruments) (kuva 6). Kuvauksessa käytettiin laitteiston fluoresenssikameraa. Fluoresenssikuvauksessa käytettiin laitteiston tarjoamaa quenching-ohjelmaa (kuva 7), jossa pimeään sopeutetussa tilassa saatiin mitattua fluoresenssin minimi- ja maksimitasot. Näistä edelleen ohjelmiston suorittamassa analyysissä laskettiin vaihteleva fluoresenssi ja fotosysteemi II:n suurin fotokemiallinen tehokkuus. Fluoresenssikameran tuottama kuva-aineisto analysoitiin Plant Screen Data Analyzer –ohjelmistolla, josta raakadata tuotiin fimg-tiedostomuodossa. Tilastollista analyysiä varten valitun aineiston kuvapikselit sisälsivät informaation solukon fotosynteesin tasoa hyvin kuvaavan ohjelmiston tarjoaman Q_y_max –suureen arvoista. Suureen lyhenne viittaa kasvin fotosynteesikoneistossa toimivan fotosysteemi II:n suurimpaan fotokemialliseen tehokkuuteen, mikä lasketaan vaihtelevan fluoresenssin (F_v) ja maksimifluoresenssin (F_m) osamääränä. Q_y_max –suure määritetään kasvin pimeään sopeutetussa tilassa. Kuvien raakaversiot käsiteltiin Fiji Is Just ImageJ –ohjelmistolla (The National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Kuvat muutettiin tiff-tiedostomuotoon, puhdistettiin virheellisistä objekteista ja taustan pikseleiden arvo asetettiin nolaksi. Tällöin oli mahdollista ohjelmoidusti siirtää näytteeseen kuuluvien pikseleiden numeerinen informaatio erillisiin Excel-tiedostoihin. Jokaisesta tähkylästä erikseen jokaiselle kuvausajankohdalle saatu Excel-tiedosto vietiin tilastollista analyysiä varten RStudio –ohjelmistoon. (versio 3.5.1, RStudio Inc., Boston, MA, USA). RStudio –ohjelmistolla suoritetuissa tilastollisissa analyyseissä käytettiin yksi- ja kaksisuuntaista varianssianalyysiä sekä Tukeyn testiä. Lajikevertailukokeessa yksisuuntaista varianssianalyysiä sovellettiin sekamallissa. Analyysissä infektion etenemistä tähkylöissä tarkasteltiin oireisen solukon koon kasvun ja taudin ankaruuden kehittymisen avulla. Oireisen solukon koko tähkylässä laskettiin Q_y_max –suureen arvoista jakamalla infektoituneiden tähkylän osien, eli arvon 0,75 alittavien kuvapikseleiden määrä tähkylän kuvapikseleiden kokonaismäärällä. Taudin ankaruus puolestaan ilmaistiin vastaavasti Q_y_max –suureen arvon 0,75 alittavien kuvapikseleiden arvojen (F_v/F_m) keskiarvona. Aikasarjasta koostettiin infektion

etenemistä havainnollistavia kuvaajia. Tilastolliset testit kattoivat kasvatusalustojen vertailukokeessa kaikki aikasarjan pisteet ja lajikevertailukokeessa valittiin kaksi aikapistettä tarkasteltaviksi.



Kuva 6. NaPPI:n pienten kasvien ympäristö. Kokeen petrimaljoja kuvauskammiossa (a) ja Plant Screen Compact System –laitteiston työasema ja kuvauskammio ulkoa päin (b).



Kuva 7. Quenching-ohjelma (PSI 2016). Punaisella merkittynä fotosysteemi II:n suurimman fotokemiallisen tehokkuuden ($Q_y\text{_{max}}$) analysointiin tarvittavat arvot. Tämä suure määritetään kasvin pimeään sopeutetussa tilassa.

6.5 Kasvatusalustojen vertailukoe

6.5.1 Kokeen kulku

Kasvatusalustojen vertailukokeessa tutkittiin erilaisten petrimaljoille soveltuvien *in vitro* –kasvatusalustojen kelpoisuutta kauran tähkylöiden kasvattamiseen, punahometartunnan aikaansaamiseen ja infektiön etenemisen seurantaan varsinaista lajikevertailukoetta varten. Kasvatusalustojen vertailukoe toteutettiin helmimaaliskuussa 2018. Kasvatusalustojen vertailukokeessa käytettiin samaa kasvimateriaalia kuin kasvun ja morfologian seurantakokeessa. Kasveista kerättyjen kauran tähkylöiden kasvatusalustoiksi valittiin vesi-agar (A), perunan dekstroosiagar (PDA) ja Murashige & Skoog –agar ilman sokeria (MS). Agarin (erä P1001.1000, Duchefa Biochemie bv, Haarlem, Alankomaat) pitoisuus kasvatusalustoissa oli 0,008 g/ml, perunan dekstroosin 0,024 g/ml ja Murashige & Skoogin ravinteiden (erä M0255.0010, Duchefa Biochemie bv) 0,00245 g/ml. Kymmenen petrimaljan valmistusta varten autoklaavipulloon punnittiin 2 g agaria ja MS-alustoihin lisäksi 0,6125 g Murashige & Skoog –valmistetta sekä PDA-alustoihin 6 g perunadekstroosia. Kuiva-aineiden jälkeen pulloon mitattiin 250 ml milli Q –vettä ja liuos autoklavoitiin noin 15 minuutin ajan.

Lopuksi kasvatusalustat valettiin laminaarikaapissa petrimaljoille. Kasvatusalustojen vertailukokeeseen valittiin kaksi genotyyppiä, Akseli ja Sofiina, niiden etukäteen tunnettujen kestävyyserojen perusteella.

Tähkylät olivat koejäseniä, joita kerättiin molemmista genotyypeistä molemmissa tähkylöiden keräystavoissa yhteensä 36 kuudelle kasvatusalustalle. Kasvatusalustat toimivat kokeessa koeyksikköinä, joista jokaiseen sisältyi kuusi koejäsentä. Molemmista genotyypeistä kolme koeyksikköä tartutettiin ja kolme toimi kontrolleina. Nämä kolme koeyksikköä molemmista käsittelyistä edustivat kasvatusalustoja A, MS ja PDA. Koeasetelma toistettiin tähkylöiden keräystapojen mukaan kahdesti siten, että ensimmäiseen toistoon tähkylät kerättiin kaksi päivää ennen tartutusta ja toiseen tartutuspäivänä. Yhteensä koejäseniä oli siten 144 ja koeyksiköitä 24. Koe tartutettiin luvussa 6.3 esitetyllä tavalla.

6.5.2 Fluoresenssi- ja kuva-aineiston keruu ja analysointi

Aineiston keruu, käsittely ja tilastollinen analyysi tehtiin luvussa 6.4 esitetyllä tavalla. Kasvatusalustojen vertailukoe kuvattiin Plant Screen Compact System –laitteistossa fluoresenssi- ja lisäksi RGB-kameroilla 1-3 kertaa vuorokaudessa alkaen ensimmäisen tähkylöiden keräyserän siirtämisestä laitteistoon kaksi päivää ennen tartutusta. Kokeen tartutusta seuraavasta päivästä lähtien koe kuvattiin kolmesti vuorokaudessa kahdeksan tunnin välein neljän vuorokauden ajan.

Tilastollisessa analyysissä testattiin genotyypin, kasvatusalustan ja niiden yhteisvaikutuksen vaikutusta oireisen solukon koon kasvuun sekä taudin ankaruuden kehittymiseen tähkylöissä. Näitä suureita tarkasteltiin fotosystemi II:n suurimman fotokemiallisen tehokkuuden (Q_y_{max}) suhteen erikseen molemmissa tähkylöiden keräystavoissa. Tukeyn testillä parittaisessa vertailussa tarkasteltiin edellä mainittujen tekijöiden välillä esiintyviä tilastollisesti merkitseviä eroja aikasarjan pisteissä. Kasvatusalustojen välillä mahdollisesti esiintyviä eroja tarkasteltiin yksi- ja kaksisuuntaisen varianssianalyysin tulosten perusteella sekä lisäksi RGB-kuvista koostetun aikasarjan ja silmämääräisten havaintojen perusteella. Visuaalisissa havainnoissa kiinnitettiin huomioita sienirihmaston runsauteen ja sen mahdolliseen vaikutukseen fluoresenssikuvien käsittelyssä, petrimaljan kannen alla esiintyvään

kosteuteen, taudinaiheuttajan itiömuodostukseen sekä tähkylöiden menestymiseen kasvatusalustalla.

6.6 Lajikevertailukoe punahometartutuksilla

6.6.1 Koemateriaalin kasvatus ja kokeen kulku

Varsinaisessa lajikevertailukokeessa seurattiin punahometartunnan etenemistä eri kauragenotyypeistä irrotetuissa ja petrimaljoille asetetuissa tähkylöissä hyödyntäen NaPPI:n pienten kasvien ympäristön fluoresenssikameraa sekä visuaalisesti värivalokuvien avulla. Kokeessa analysoitiin genotyyppien välisiä eroja punahomeresistenssissä punahometartunnan seurauksena heikkenevän fotosynteesin perusteella seuraamalla tartunnan jälkeen tähkylöiden fluoresenssissa tapahtuvien muutosten nopeutta. Punahomeen tartutus toteutettiin pistetartutuksena suoraan tähkylän sisään, jolloin kyettiin arvioimaan genotyypin aktiivista resistenssiä ilman, että esimerkiksi röyhyn tai tähkylän rakenne tai kukintatapa vaikuttivat tartunnan saamiseen. Koe toteutettiin helmi-kesäkuussa 2018. Koetta varten Helsingissä Helsingin yliopiston Viikin kasvihuoneilla NaPPI:n suurten kasvien ympäristössä kasvatettiin seitsemää valittua kauragenotyyppiä kymmenen kasviyksilöä jokaista. Kasvit kylvettiin kahdessa erässä ja porrastetusti genotyyppien kasvuajan perusteella 1.2., 19.2., 22.2., 26.2., 1.3. ja 5.3.2018. Ensimmäisessä erässä kunkin genotyypin aikaisuuden mukaan porrastetusti kylvettiin viisi kasviyksilöä ja toisessa erässä loput viisi viikon kuluttua ensimmäisistä. Porrastamalla kasvien kylvö, pyrittiin saamaan aikaisuudeltaan keskenään erilaiset genotyypit aloittamaan kukinta mahdollisimman yhtäaikaisesti. Kylvön jakamisella kahteen erään viikon aikavälillä pyrittiin puolestaan tasaamaan porrastuksesta huolimatta mahdollisesti syntyvää genotyyppien eriaikaisuutta. Genotyyppien kylvön porrastus aikaisuuden mukaan suunniteltiin kasvun ja morfologian seurantakokeessa tehtyjen aikaisuushavaintojen perusteella.

Kokeessa käytetyn kasvimateriaalin kylvö ja muut toimenpiteet toteutettiin samoin kuin kasvun ja morfologian seurantakokeessa. Kasvihuoneessa lämmityslämpötila päivällä asetettiin +14°C:een ja yöllä +10°C:een ja tuuletuslämpötila vastaavasti päivällä +15°C:een ja yöllä +11°C:een. Kevään edetessä aurinkoisina päivinä kasvihuoneen todelliset päivälämpötilat nousivat kuitenkin merkittävästi tavoitelämpötilojen

yläpuolelle, kuumimpina päivinä yli +25°C:een. Voimakkaan auringonsäteilyn pääsyä kasvihuoneeseen hillittiin varjostusverhojen avulla. Päivänpituudeksi asetettiin 18 tuntia ja valojen sammumisen säteilyrajaksi 200 W/m². Kasviyksilöiden järjestys kasvihuoneessa satunnaistettiin kylvön yhteydessä ja lisäksi kasvien paikkaa muutettiin koko kasvatuksen ajan kierrättämällä niitä siten, että kukin kasvi oli vuoroin lähempänä ja vuoroin kauempana kasvihuoneen seinää.

Seuraavana esitellystä koemallista toteutettiin toukokuussa 2018 kaksi identtistä toistoa. Kokeessa olivat edustettuna kaikki seitsemän genotyyppiä. Tartutettavaksi tulevat tähkylät kerättiin kasveista kaksi päivää ennen tartutusajankohtaa MS-alustoille. Kasvatusalustat valmistettiin vastaavalla tavalla, kuin kasvatusalustojen vertailukokeessa poikkeuksena, että alustojen pH asetettiin kaliumhydroksidin avulla tasolle 5,7–5,8. Tähkylät olivat koejäseniä, joita kerättiin jokaisesta genotyypistä jokaiseen kerranteeseen 16 kahdelle kasvatusalustalle. Kasvatusalustat toimivat kokeessa koeyksikköinä, joista jokaiseen sisältyi kahdeksan koejäsentä (kuva 9). Jokaisesta genotyypistä toinen koeyksikkö tartutettiin ja toinen toimi kontrollina. Jokaista koejäsentä oli kaksi kerrannetta, jolloin koejäseniä oli molemmissa kokeen toistoissa yhteensä 224 ja koeyksiköitä 28. Tähkylät kerättiin ja tartutettiin samalla tavoin, kuin kasvatusalustojen vertailukokeessa, luvussa 6.3 esitellyllä tavalla. Kunkin genotyypin tähkylät kerättiin tasaisesti ja satunnaisesti 4–5 eri kasviyksilöstä. Tartuke valmistettiin luvussa 6.3 esitellyllä tavalla. Poikkeuksena tartukkeen valmistuksessa ennen Vortex-laitteella suoritettua ravistelua, sienirihmasto hienonnettiin veitsellä kuromaitiöiden riittävän runsaan saannin varmistamiseksi.



Kuva 9. 8 koejäsentä Odal-genotyypistä asetettuna petrimaljalle ennen tartutusta.

6.6.2 Fluoresenssi- ja kuva-aineiston keruu ja analysointi

Aineisto kerättiin ja analysoitiin toukokuussa 2018 luvussa 6.4 esitellyin tavoin. Lajikevertailukokeen toistot kuvattiin Plant Screen Compact System –laitteistossa fluoresenssikameralla 1-2 kertaa vuorokaudessa alkaen heti tartutuksen jälkeen. Ensimmäistä kokeen toistoa kuvattiin kerran vuorokaudessa 24 tunnin välein ensimmäisten neljän vuorokauden ajan ja tämän jälkeen kahdesti vuorokaudessa vuoroin 18 ja vuoroin kuuden tunnin välein viimeisten kahden vuorokauden ajan. Toista kokeen toistoa kuvattiin ensin 24 tunnin kuluttua tartutuksesta ja tämän jälkeen viiden vuorokauden ajan kahdesti vuorokaudessa vuoroin 18 ja vuoroin kuuden tunnin välein. Automaattisen kuvauksen lisäksi toisessa kokeen toistossa kuvattiin kahta genotyyppiä järjestelmäkameralla (Canon EOS 760D, Canon Inc., Tokio, Japani) kerran vuorokaudessa 24 tunnin välein kuuden vuorokauden ajan infektion oireiden etenemisen havainnoimiseksi. Järjestelmäkameralla kuvattiin genotyyppinä Odal ja VIR 14720, molemmista sekä tartutettua, että kontrollikäsittelyä.

Tilastollisessa analyysissä molempien toistojen aineisto yhdistettiin ja analysoitiin soveltaen sekamallia yksisuuntaisessa varianssianalyysissä ja Tukeyn testissä. Tilastollisessa analyysissä tarkasteltiin genotyypin vaikutusta oireisen solukon koon kasvuun sekä taudin ankaruuden kehittymiseen tähkylöissä. Tukeyn testissä tarkasteltiin

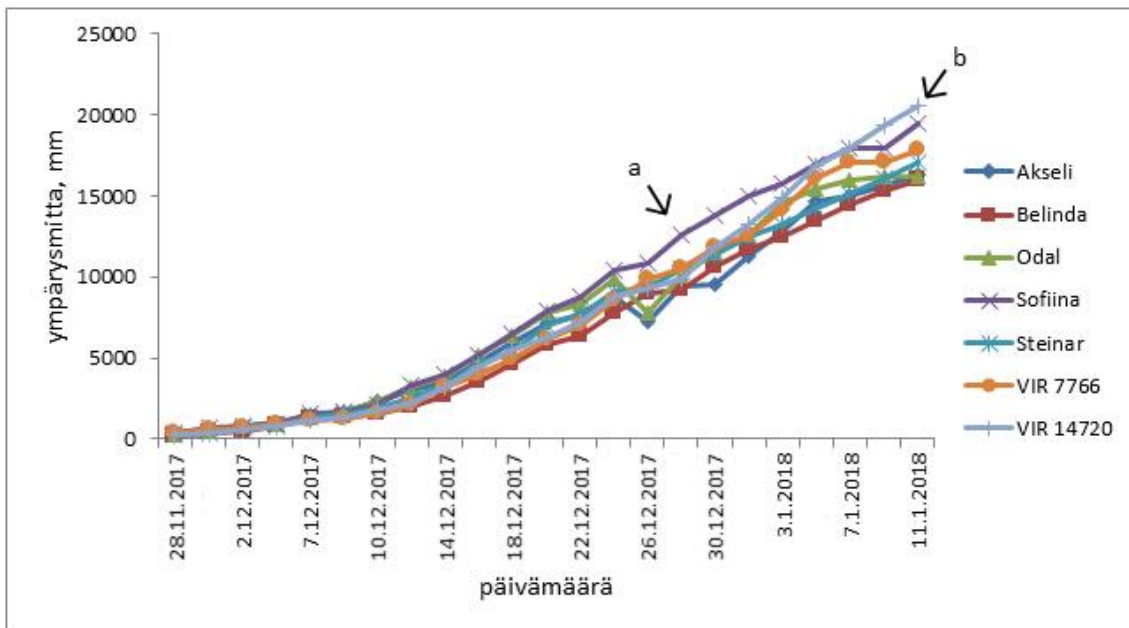
genotyyppien välillä esiintyviä tilastollisesti merkitseviä eroja tartutuspäivänä sekä taudin etenemisen suhteen kriittiseksi todettuna ajankohtana kolme vuorokautta tartutuksen jälkeen.

7 TULOKSET

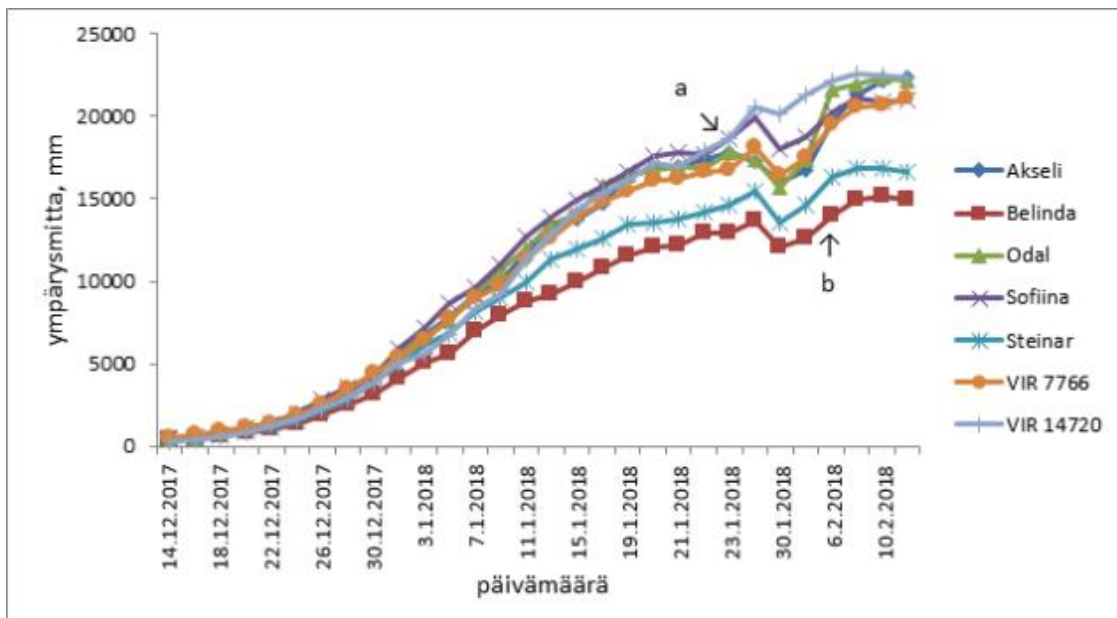
7.1 Kauran kasvun ja morfologian seuranta

7.1.1 Ympärysmitta

Ohjelmiston mittaamista morfologisista ominaisuuksista kasvien ympärysmitta valittiin syvempään tarkasteluun, koska siinä genotyyppien väliset erot tulivat parhaiten esille. Genotyyppi vaikutti kasvin sivulta mitattuun ympärysmittaan kokeen kummassakin toistossa ja sekä kaksi viikkoa ennen röyhyn esiintuloa että röyhyn esiintulon aikaan. Lisäksi kerranne vaikutti ympärysmittaan merkitsevästi kokeen toisessa toistossa röyhyn esiintulon aikaan. Genotyypin ja kerranteen yhteisvaikutus oli merkitsevä samassa toistossa kaksi viikkoa ennen röyhyn esiintuloa. Kasvien ympärysmitta todettiin ennen varianssianalyysin suorittamista normaalijakautuneeksi. Parittaisessa vertailussa genotyyppien väliset erot vaihtelivat kokeen toistojen ja tarkasteltujen aikapisteiden välillä (liite 1). Kokeen ensimmäisessä toistossa (kuva 10) kaksi viikkoa ennen röyhyn esiintuloa ainoastaan Sofiina poikkesi ympärysmitaltaan suurempana muista genotyypeistä, kun toisessa toistossa (kuva 11) Sofiina oli merkitsevästi suurempi vain osaan genotyypeistä verrattuna. Toisessa toistossa myös muut genotyypit erottuivat tilastollisesti suurempina, kuin tilastollisesti pienimmät genotyypit Belinda ja Steinar. Sofiinan ympärysmitta kasvoi genotyypeistä nopeimmin ensimmäisessä toistoissa ja oli nopeimpien joukossa myös toisessa toistossa. Röyhyn esiintulon aikaan etenkin VIR 14720 ja VIR 7766 ottivat ympärysmitassa Sofiinaa kiinni ja VIR 7766 myös ohitti Sofiinan. Kokeen ensimmäisessä toistossa röyhyn esiintulon aikaan Sofiinan lisäksi VIR 7766 poikkesi useimpia muita genotyyppejä suurempana. Kokeen toisessa toistossa vastaavassa aikapisteessä lähinnä pienimmät genotyypit Belinda ja Steinar erottuivat selkeästi muista, muiden otettua Sofiinaa ja VIR 7766:tta ympärysmitassa kiinni. Yleisesti ottaen genotyyppien välillä havaitut erot olivat kokeen ensimmäisessä toistossa yksiselitteisempiä, kuin toisessa toistossa.



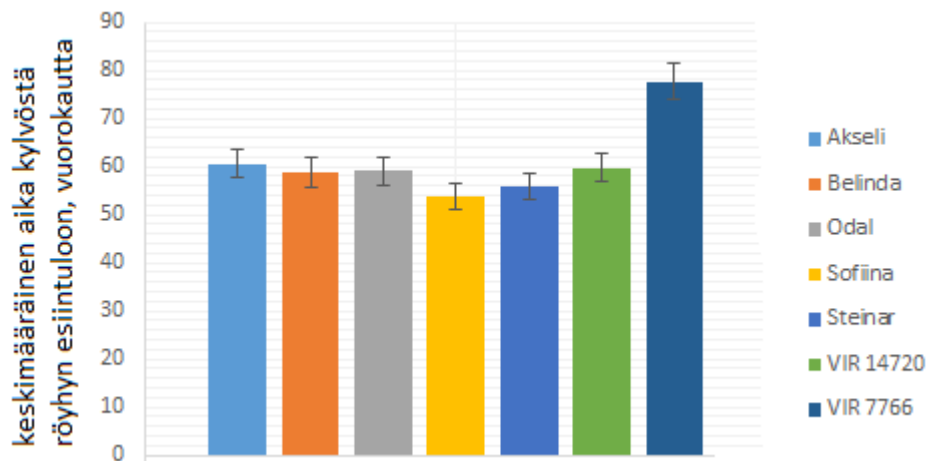
Kuva 10. Kasvin sivulta kuvatun ympärysmitan kehitys kauran kasvun ja morfologian seurantakokeen ensimmäisessä toistossa. Sofiina oli muita genotyyppijä suurempi kaksi viikkoa ennen röyhyn esiintuloa 28.12.2017 merkitsevyystasolla 0,01 (a). VIR 7766 oli tilastollisesti muita, kuin Sofiinaa suurempi ja Sofiina muita, kuin genotyyppijä VIR 14720 ja VIR 7766 suurempi viimeisessä aikapisteessä röyhyn tullessa esiin 11.1.2018 (b). Ympärysmitan äkillinen pieneneminen 24.12.2017 jälkeen johtui kasvien tukemisesta teipillä tukikeppiin.



Kuva 11. Kasvin sivulta kuvatun ympärysmitan kehitys kasvun ja morfologian seurantakokeen toisessa toistossa. Erot genotyyppien ympärysmittassa on kuvattu tarkemmin liitteessä 1. Ympärysmitan äkillinen pieneneminen 23.1.2018 jälkeen johtui kasvien tukemisesta teipillä tukikeppiin.

7.1.2 Havainnot genotyyppien kukinnan aikaisuudesta

Silmämääräisten havaintojen perusteella genotyypit erosivat aikaisuudeltaan toisistaan. Keskimääräinen aika kasvin kylvöstä hetkeen, jolloin sen röyhy oli kokonaan työntynyt esiin tupesta, vaihteli genotyypistä riippuen 54:stä 78:aan vuorokauteen (kuva 12). Kasvuajojen keskihajonta vaihteli niin ikään genotyypistä riippuen välillä 1,4–4,4 vuorokautta. Genotyypeistä aikaisin oli Sofiina, jonka kasvu ja kehitys määrättyyn vaiheeseen kesti keskimäärin 54 vuorokautta kerranteiden välisen keskihajonnan ollessa 4,4 vuorokautta. Kukinnaltaan aikaisimmat genotyypit Sofiinan jälkeen olivat järjestyksessä Steinar, Belinda, Odal, VIR 14720 ja Akseli. Selvästi myöhäisin genotyyppi oli VIR 7766, jonka kasvu-aika kylvöstä röyhylle tuloon vastaavasti oli 78 vuorokautta ja kerranteiden välinen keskihajonta 3,3 vuorokautta.

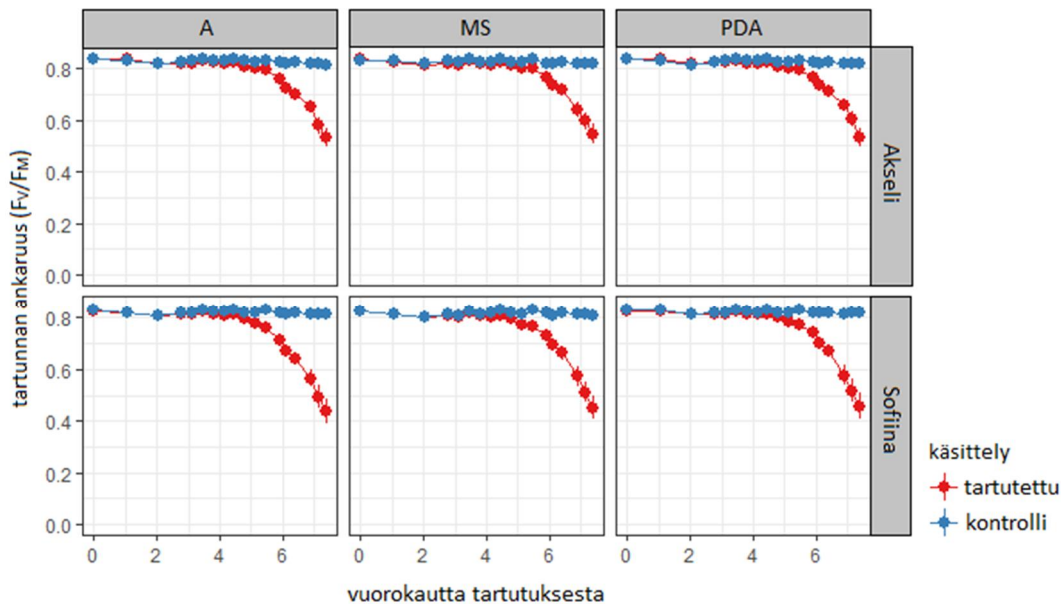


Kuva 12. Genotyyppien keskimääräinen kokeessa havaittu kasvu-aika (vrk) kylvöstä hetkeen, jolloin röyhy on kokonaan näkyvissä.

7.2 Kasvatusalustojen vertailu

Fluoresenssiaineistoa kerätessä sekä kasvatusalustojen vertailu- että lajikevertailukokeessa ohjelmisto laski aineistosta neljä eri tähkylöiden fotosynteesin tasoa kuvaavaa suuretta. Näistä valittiin syvempään tarkasteluun fotosysteemi II:n suurin fotokemiallinen tehokkuus ($Q_y\text{max}$), joka osoitti selkeimmin genotyyppien väliset erot tartunnan etenemisessä. Punahometartunnan seurauksena tähkylöiden fotosynteesi alkoi heiketä ja siten taudin ankaruus voimistua kaikilla kasvatusalustoilla sekä molemmissa genotyypeissä (kuva 13). Keskimäärin tartunnan oireet alkoivat erottua kontrollista noin viiden vuorokauden kuluttua tartutuksesta. Vedellä

tartutetussa kontrollissa tähkylöiden fotosynteesi säilyi kaikilla kasvatusalustoilla läpi kokeen keskimäärin normaalilla terveen solukon tasolla. Silmin nähden eroja infektion etenemisnopeudessa kasvatusalustojen tai tähkylöiden keräystapojen välillä ei ollut mahdollista havaita, mikä tukee löytyneiden tilastollisesti merkitsevien erojen vähäisyyttä infektion kehittymisen aikana.



Kuva 13. Punahomeinfektion ankaruuden kehitys kasvatusalustojen vertailukokeessa vesi-agarilla (A), Murashige & Skoog –agrilla (MS) ja perunan dekstroosiagarilla (PDA).

Tilastollisesti kasvatusalustojen välillä ei juuri ollut eroa kasvin ja taudinaiheuttajan välisessä interaktiossa. Muutamissa aikapisteissä ja tähkylöiden keräystavoissa kasvatusalustalla oli kuitenkin tilastollista vaikutusta tartunnan etenemisnopeuteen. Yksisuuntaisen varianssianalyysin mukaan kasvatusalusta vaikutti taudin ankaruuteen ja oireisen solukon kokoon osoittaen tähkylöiden fotosynteesin heikkenevän hieman eri tahtia eri kasvatusalustoilla. Vaikutus ilmeni kuitenkin ainoastaan lajikkeessa Akseli (taulukko 1). Kasvatusalustan vaikutus taudin ankaruuteen ilmeni kaksi päivää ennen tartutusta kerätyissä tähkylöissä vuorokauden kuluttua tartutuksesta sekä tartutuspäivänä kerätyissä tähkylöissä kolmen vuorokauden kuluttua tartutuksesta. Näissä tilanteissa vaikutus ilmeni merkitsevyystasolla 0,01. Lisäksi kasvatusalusta vaikutti merkitsevyystasolla 0,05 myös oireisen solukon kokoon taulukon 1 osoittamalla tavalla. Vedellä tartutetuissa kontrolleissa ei ilmennyt kasvatusalustojen välisiä eroja

lukuun ottamatta tartutuspäivänä kerättyjä Sofiinan tähkylöitä, joissa kolmessa aikapisteessä seurannan loppuvaiheessa mahdollisesti jokin ylimääräinen kontaminaatio aiheutti tilastollisesti havaittavia eroja tähkylöiden fotosynteesin heikkenemisen nopeudessa.

Taulukko 1. Tilastollisesti merkitsevä yksisuuntaisessa varianssianalyysissä punahomeella tartutetuissa Akseli-genotyypin tähkylöissä havaittu kasvatusalustan vaikutus oireisen solukon kokoon (K) ja taudin ankaruuteen (A) 2 päivää ennen tartutusta (2) ja tartutuspäivänä (0) kerätyissä tähkylöissä.

Genotyyppi	Mitattava suure	Tähkylöiden keräystapa	Vuorokautta tartutuksesta	Neliöiden summa	Vapausasteet	Keskineliö	F-arvo
Akseli	K	2	1	0,0049	2	0,0024	4,82*
			3	0,0182	2	0,0091	4,63*
			4	0,0182	2	0,0091	3,83*
	A	2	1	0,0004	2	0,0002	11,11**
			3	0,0005	2	0,0002	7,14**
			0				

*, **: $P < 0,05$, $P < 0,01$

Kaksisuuntainen varianssianalyysi antoi samansuuntaisia tuloksia, kuin yksisuuntainen testi, vaikkakin kasvatusalustan vaikutus tartunnan etenemisnopeuteen ilmeni osin eri aikapisteissä ja tähkylöiden keräystavoissa. Kasvatusalusta vaikutti tilastollisesti tartunnan etenemisnopeuteen ainoastaan kolmessa tilanteessa taulukon 2 mukaisesti. Lisäksi genotyyppi vaikutti tartunnan etenemiseen siten, että Sofiinassa tartunta eteni nopeammin, kuin Akselissa. Kasvatusalustan ja genotyypin yhteisvaikutuksella ei löydetty vaikutusta tartunnan etenemisnopeuteen, minkä perusteella molemmat kauragenotyypit käyttäytyivät samalla tavoin eri kasvatusalustoilla. Vedellä tartutetussa kontrollissa ylimääräistä kontaminaatiota näkyi myös kaksisuuntaisen varianssianalyysin perusteella, mutta eri koeyksiköissä, kuin yksisuuntaisen testin perusteella. Yksittäisissä kaksi päivää ennen tartutusta kerätyissä koeyksiköissä mahdollinen kontaminaatio vaikutti tuloksiin saaden aikaan tilastollisia eroja tähkylöiden fotosynteesin heikkenemisen nopeudessa kasvatusalustojen välille. Kontaminaatio aiheutti vastaavasti eroja myös genotyyppien välille.

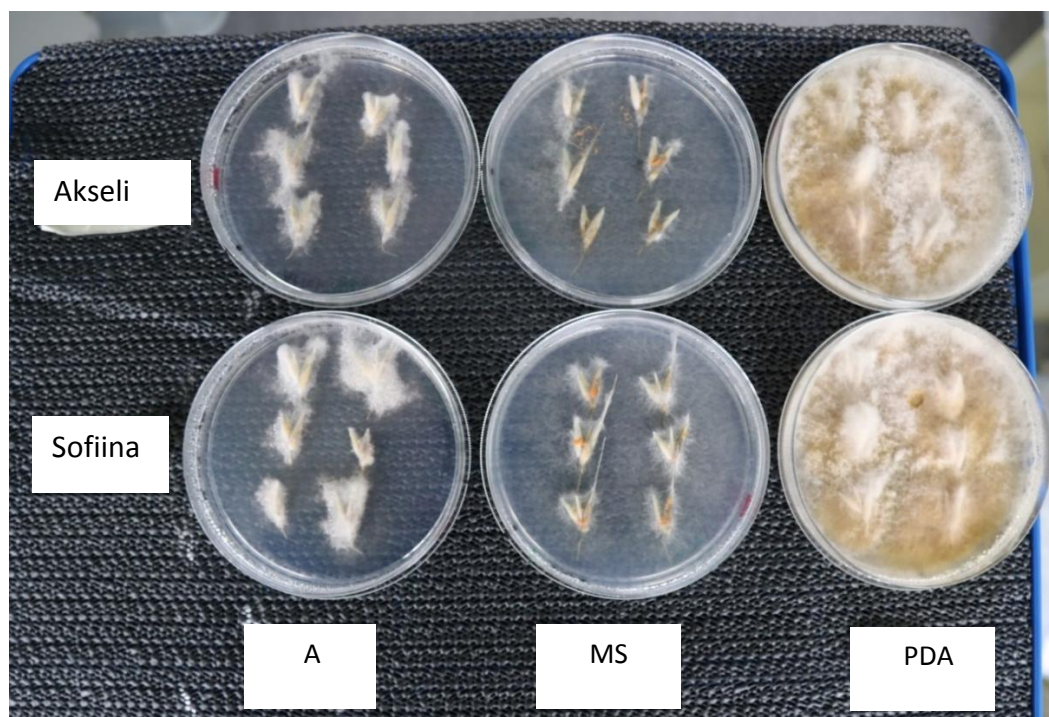
Taulukko 2. Tilastollisesti merkitsevä kaksisuuntaisessa varianssianalyysissä punahomeella tartutetuissa tähkylöissä havaittu kasvatusalustan vaikutus oireisen

solukon kokoon (K) ja infektion ankaruuteen (A) 2 päivää ennen tartutusta (2) ja tartutuspäivänä (0) kerätyissä tähkylöissä.

Vaihtelun lähde	Mitattava suure	Tähkylöiden keräystapa	Tuntia tartutuksesta	Neliöiden summa	Vapaus-asteet	Keski-neliö	F-arvo
Kasvatusalusta	K	2	50	0,0387	2	0,0193	4,04*
		0	83	0,0005	2	0,0002	3,7*
	A	0	75	0,0005	2	0,0002	5,65**

*, **: $P < 0,05$, $P < 0,01$

Vaikka tilastollisessa analyysissä ja silmämääräisissä havainnoissa ei löytynyt juurikaan eroja kasvatusalustojen välillä, kuitenkin infektion ollessa pitkälle edennyt, sienirihmaston runsaudessa ilmeni eroja kasvatusalustojen välillä. PDA-alustoilla rihmastoa kasvoi nopeimmin ja runsaimmin ja petrimaljat peittyivät kokonaan vaaleaan sienirihmaston (kuva 14). Lisäksi MS-alustalla alkaen 5-6 vuorokauden kuluttua tartutuksesta havaittiin myös runsaasti oransseja pyöreähköjä laikkuja, jotka saattoivat johtua taudinaiheuttajan kuromaitiöiden muodostuksesta. Muilla kasvatusalustoilla tällaisia havaittiin vain hyvin pienissä määrin.



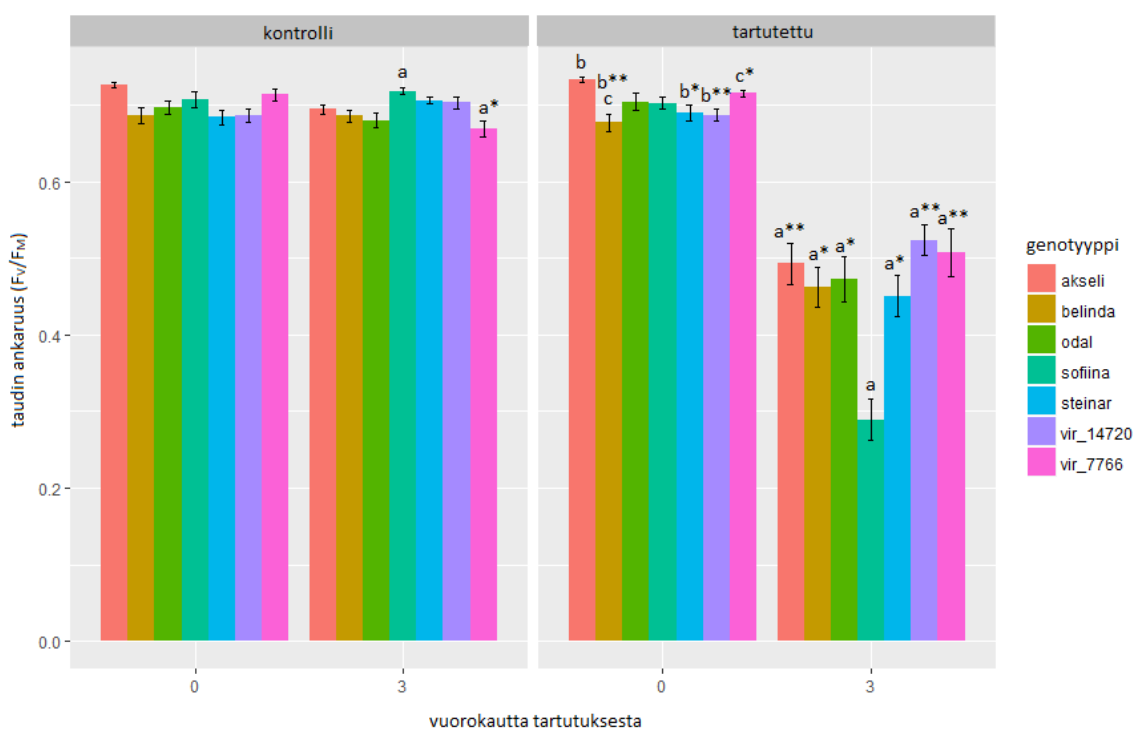
Kuva 14. Kasvatusalustojen vertailukokeen maljoja 8 vuorokautta tartutuksen jälkeen. Sienirihmasto on täyttänyt PDA-maljat kauttaaltaan.

7.3 Lajikkeiden vertailu

7.3.1 Fotosynteesin heikkeneminen tähkylöissä

Lajikevertailukokeessa havaittiin varianssianalyysin perusteella, että punahomeella tartutetuissa tähkylöissä genotyyppi vaikutti tilastollisesti taudin ankaruuteen tartutuspäivänä ja kolmen vuorokauden kuluttua tartutuksesta sekä oireisen solukon kokoon kolmen vuorokauden kuluttua tartutuksesta. Fotosynteesi heikkeni siten eri nopeudella eri genotyyppien tähkylöissä. Vedellä tartutetussa kontrollissa genotyyppien välillä ei juurikaan ilmennyt eroja tähkylöiden fotosynteesissä.

Parittaisen vertailun perusteella punahomeella tartutetuissa tähkylöissä Sofiina poikkesi muista altteimpana genotyyppinä. Kolmen vuorokauden kuluttua tartutuksesta tähkylöiden fotosynteesi Sofiinassa oli heikentynyt merkitsevästi enemmän, kuin muissa genotyypeissä (kuva 15). Merkitsevimmän Sofiina poikkesi genotyypeistä Akseli, VIR 14720 ja VIR 7766 (taulukko 3). Tarkasteluajankohtana kestävimmissä VIR 14720 – genotyyppissä fotosysteemi II:n keskimääräinen suurin fotokemiallinen tehokkuus (Q_y_{max}) oli 0,235 yksikköä suurempi, kuin Sofiinassa. Tartutuspäivänä taudin ankaruus poikkesi merkitsevästi Akselin ja Steinarin, Akselin ja VIR 14720:n, Akselin ja Belindan sekä Belindan ja VIR 7766:n välillä. Tartutuspäivänä infektion vaikutus tähkylöiden fotosynteesiin oli kuitenkin pientä, sillä fotosynteesi oli silloin hyvin samalla tasolla, kuin kontrollissa. Lisäksi tähkylöiden fotosynteesi vaihteli hieman myös kontrollissa, missä kolmen vuorokauden kuluttua tartutuksesta Sofiina ja VIR 7766 poikkesivat myös tilastollisesti kuvan 15 mukaisesti.



Kuva 15. Punahomeinfektion ankaruuden kehitys kauran tähkylöissä genotyypeittäin tartutuspäivänä ja kolmen päivän kuluttua tartutuksesta. Genotyypin tilastollisesti merkitsevä poikkeavuus genotyypistä Sofiina (a), Akseli (b) ja Belinda (c) osoitettu symboleilla *($P < 0,05$) ja **($P < 0,01$).

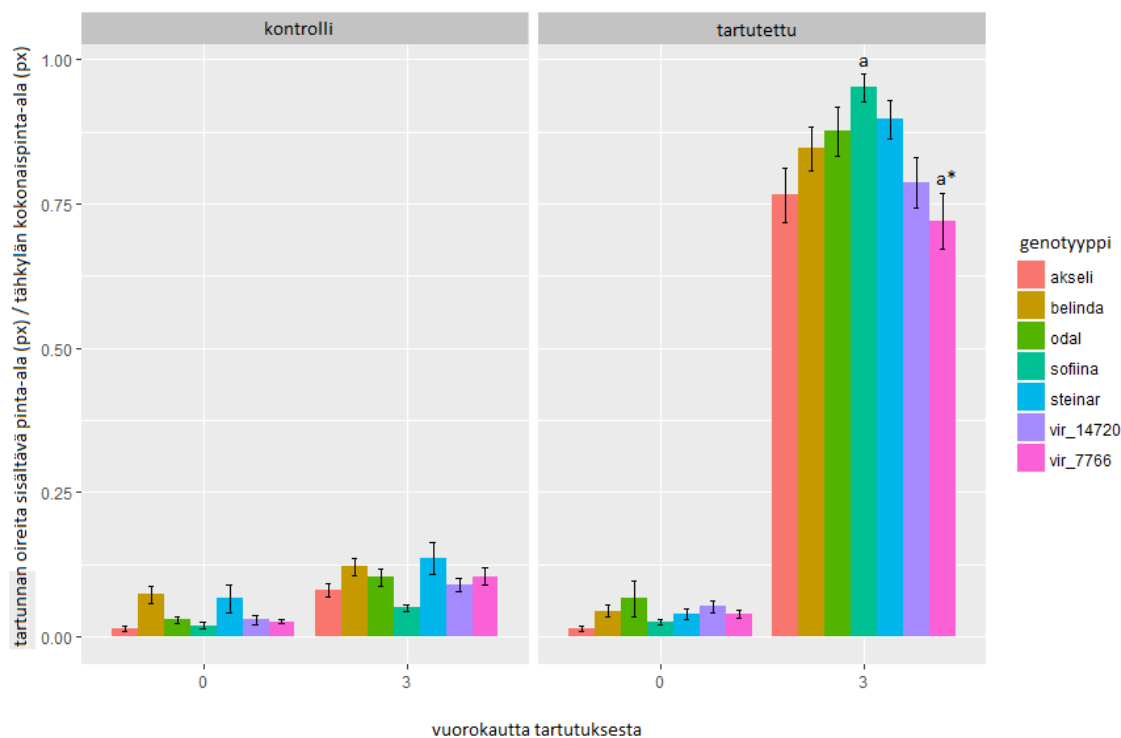
Taulukko 3. Parittainen vertailu (Tukey HSD) seitsemän kauragenotyypin välisistä eroista infektion ankaruudessa punahomeella tartutetuissa tähkylöissä kolmen vuorokauden kuluttua tartutuksesta.

Genotyyppi	Taudin ankaruuden keskiarvoero (F_v/F_m) y-x					
	Belinda	Odal	Sofiina	Steinar	VIR 14720	VIR 7766
Akseli	0,03	0,02	0,204**	0,042	-0,031	-0,014
Belinda		-0,01	0,174*	0,012	-0,061	-0,044
Odal			0,183*	0,022	-0,051	-0,035
Sofiina				-0,162*	-0,235**	-0,218**
Steinar					-0,073	-0,056
VIR 14720						0,017

*, **: $P < 0,05$, $P < 0,01$

Tarkasteltaessa oireisen solukon kokoa punahomeella tartutetuissa tähkylöissä ilmeni ainoastaan yksi genotyyppien välinen tilastollisesti merkitsevä poikkeavuus. Sofiinan

tähkylöissä oireisen solukon osuus oli kolmen vuorokauden kuluessa tartutuksesta kasvanut suuremmaksi, kuin muissa genotyypeissä. Sofiinasta poikenneessa VIR 7766:ssa oireisen solukon osuus oli pienin (kuva 16). Kontrollissa tilastollisesti merkitseviä eroja genotyyppien väliltä ei löytynyt.



Kuva 16. Punahomeinfektion oireita sisältävän alan kasvu kauran tähkylöissä suhteutettuna tähkylän kokoon genotyypeittäin tartutuspäivänä ja kolmen päivän kuluttua tartutuksesta. Genotyypin tilastollisesti merkitsevä poikkeavuus genotyypistä Sofiina (a) osoitettu symboleilla *($P < 0,05$) ja **($P < 0,01$).

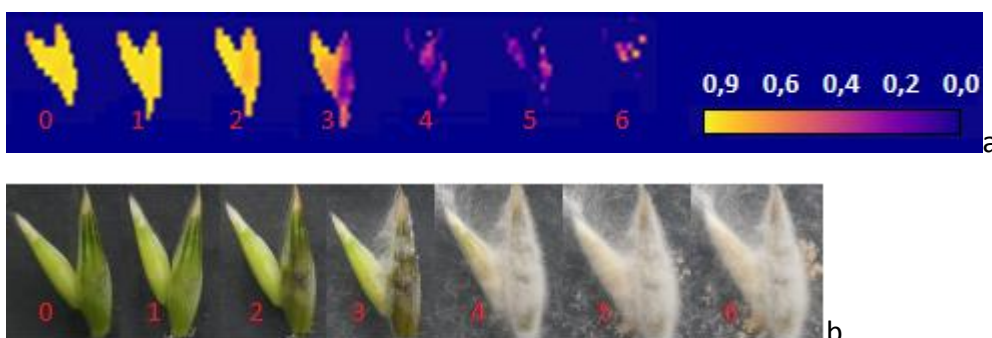
7.3.2 Infektion eteneminen

Seuratessa infektion etenemistä punahomeella tartutetuissa tähkylöissä järjestelmäkameran kuvista, havaittiin punahomeen itämisajan olleen kokeen olosuhteissa kahdesta kolmeen vuorokautta. Tämän ajan kuluttua patogeenin tartutuksesta ensimmäisenä oireena tähkylän pintaan alkoi ilmaantua tummanruskeita nekroottisia laikkuja (kuva 17). Samaan aikaan vastaavassa tähkylän kohdassa huomattiin fotosynteesin heikentyneen terveen solukon arvoista. Tämän vaiheen jälkeen noin vuorokauden kuluessa vaalea sienirihmasto alkoi kasvaa ulos tähkylästä ja levitä kasvatusalustalle. Sienirihmaston kasvun tultua silminnähtäväksi, myös fotosynteesi alkoi nopeasti heiketä. Sienirihmaston peitettyä tähkylän kokonaan,

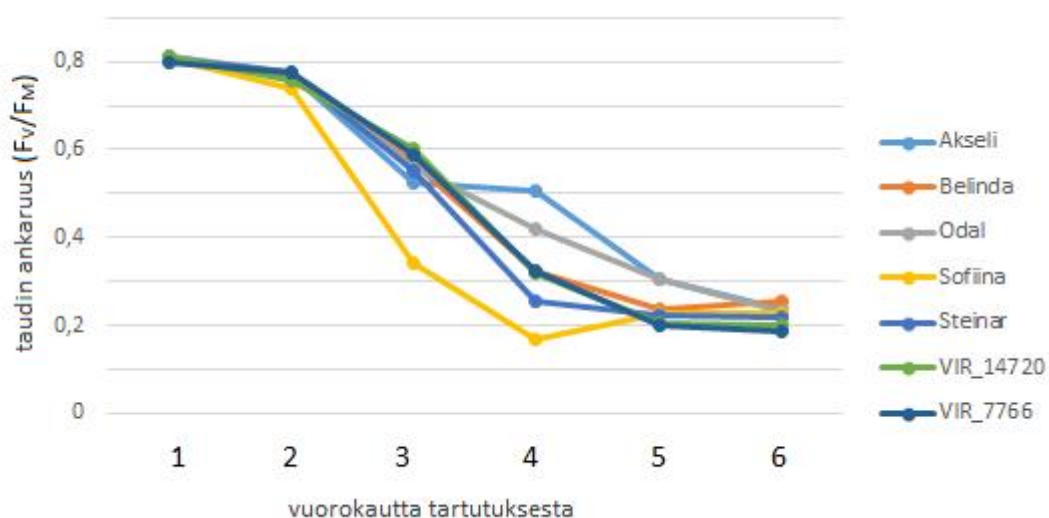
fotosysteemi II:n suurin fotokemiallinen tehokkuus tähkylän kaikissa osissa oli jo hyvin lähellä nollaa. Infektion seurannan viimeisinä hetkinä tähkylät eivät enää fluoresoineet, osoittaen taudinaiheuttajan tappaneen tähkylän solukot kokonaan. Kasvatusalustalle ja tähkylän pinnoille ilmaantui 5-6 vuorokauden kuluttua tartutuksesta myös samanlaisia oransseja laikkuja, kuin kasvatusalustojen vertailukokeessa.

Eroja infektion etenemisnopeudessa genotyyppien välillä oli haastavaa havaita silmämääräisesti. Kuitenkin Sofiina nousi tässä suhteessa esiin, infektion edettyä siinä myös silmin nähden jonkin verran muita genotyyppiejä nopeammin. Kuvassa 18 nähdään infektion etenemisnopeuden erot genotyyppien välillä Q_y_{max} -suureen arvoin lajikevertailukokeen toisessa toistossa. Myös tässä Sofiina erottuu selkeimmin muista genotyypeistä. Infektion oireet olivat visuaalisesti samanlaisia kaikissa genotyypeissä.

Tähkylöiden helpeiden kärkiosat alkoivat seurannan aikana jo pian niiden irrottamisen jälkeen vaalentua osoittaen solukon vanhenemisen ja tähkylään kohdistuvat stressitekijät. Tämä oli mahdollista havaita myös fluoresenssikuvista. Stressitekijöiden vaikutuksia saattoi pienissä määrin nähdä lisäksi myös tähkylän muissa osissa. Vedellä tartutetussa kontrollissa tähkylöiden solukko säilyi koko seurannan ajan pääosin terveenä. Kuitenkin myös kontrollissa oli sekä valokuvien että fluoresenssikuvien perusteella mahdollista havaita stressitekijöistä ja solukon vanhenemisesta johtuvaa tähkylöiden fotosynteesin heikkenemistä. Lisäksi muu selittämätön kontaminaatio aiheutti mikrobien kasvua hieman alle puolella kontrollipetrimaljoista, millä saattoi olla vaikutusta myös fotosynteesiin tähkylöissä.



Kuva 17. Punahomeinfektion eteneminen Odal-genotyyppin tähkylöissä kuuden vuorokauden kuluessa tartutuksesta osoittaen fotosynteesin heikkenemisen Q_y_{max} -suureen (F_v/F_m) arvoin (a) sekä tummanruskeiden laikkujen ja vaalean sienirihmaston ilmaantumisen (b).



Kuva 18. Punahomeinfektion ankaruuden kehitys kauran tähkylöissä genotyypeittäin tartutuksen jälkeen lajikevertailukokeen toisessa toistossa.

8 TULOSTEN TARKASTELU

8.1 Kasvun ja morfologian seurantakoe

Kauran kasvun ja morfologian seurantakokeessa pyrittiin tutkimaan kauragenotyyppien kasvutapaa ja kehitysrytmiä sekä niiden yhteyttä punahomeresistenssiin pohjustaen siten varsinaisessa lajikevertailukokeessa tutkittavia genotyyppien kestävyyseroja punahometartunnan etenemistä vastaan. Suurten kasvien NaPPI –laitteiston avulla onnistuttiin tuottamaan aineistoa kauragenotyyppien kasvun ja sen myötä niiden morfologiassa tapahtuvien muutosten seuraamiseksi sekä genotyyppien vertailemiseksi. Havaintomateriaalia oli mahdollista kerätä tehokkaasti monesta eri morfologiaa tarkastelevasta suureesta, mutta analyysissä oli mielekästä keskittyä näistä yhteen. Tarkasteltavaksi suureeksi analyysiin valittiin kasvin ympärysmitta, koska sen avulla genotyyppien kokoeroja oli mahdollista tarkastella kolmiulotteisesti. Analyysissä kyettiin erottamaan tarkasteluajankohdasta ja kokeen toistosta riippuen valitun suureen suhteen muista selkeästi erottuvia genotyyppisiä. Toistojen välillä havainnoissa oli kuitenkin eroja poikkeavuuksien määrässä ja merkitsevyydessä. Lisäksi molemmissa kokeen toistossa esiintyi sellaisia merkitseviä eroja, mitä toisessa ei löytynyt. Kuitenkin yhtäläisesti molemmissa toistoissa Sofiina ja VIR 7766 olivat tarkastelluissa kehitysvaiheissa kooltaan muita suurempia ja Belinda ja Steinar pienempiä. Nämä

havainnot olivat myös yhtenäisiä sekä kaksi viikkoa ennen röyhyn esiintuloa, että röyhyn esiintulon aikaan. Erityisesti VIR 7766 oli seurannan loppuvaiheessa kasvattanut runsaasti vegetatiivista biomassaa, mikä näkyi sen muita suurempana ympärysmittana varsinkin röyhyn esiintulon aikaan. Lisäksi morfologian seurannan aikana tehdyt havainnot genotyyppien aikaisuudesta vahvistivat niiden aikaisuudesta etukäteen tunnettua tietoa.

On kuitenkin huomattava, että pääosa havaituista eroista selittyi genotyyppien aikaisuuden eroilla. Samaan aikaan kylvettyinä genotyypit olivat tarkasteluun valituissa aikapisteissä eri kehitysvaiheissa, mikä väistämättä vaikutti niiden kokoon. Vaikka tarkasteltavat aikapisteet valittiin analyysiin röyhyn esiintulon perusteella, todellisuudessa vain osa – vaikkakin suurin osa – kasveista oli tarkasteluajankohtana ilmoitetussa kehitysvaiheessa. Esimerkiksi VIR 7766 tuli röyhylle selkeästi muita genotyyppejä myöhemmin ja oli tällöin selkeästi muita genotyyppejä suurempi ympärysmitaltaan. Koska kuva-aineiston keruu lopetettiin suurimman osan genotyypeistä tullessa röyhylle, ei aineisto käytännössä kattanut VIR 7766:n röyhylle tuloa. Kuitenkin aineistosta nähtiin VIR 7766:n ohittavan Sofiinan kasvussa toistosta riippuen jo ennen muiden genotyyppien summittaista röyhyn esiintulovaihetta. Luotettavampi tulos morfologian selittämistä genotyyppieroista olisi saatu, jos genotyyppejä olisi analysoitu keskenään samoissa kehitysvaiheissa. Tämä olisi kuitenkin vaatinut joko oikean kehitysvaiheen haarukointia kuva-aineiston avulla jokaiselle kasviyksilölle erikseen tai kasvien kylvön porrastusta genotyyppien aikaisuuden mukaan. Joka tapauksessa kokeen avulla osoitettiin, että kasvien morfologiaa seuraamalla genotyyppien aikaisuuseroja voidaan vertailla.

Tarkastellun morfologisen suureen sekä lajikevertailukokeessa havaitun ja genotyyppien ennalta tunnetun punahomekestävyyden yhteyttä oli kokeen perusteella kuitenkin haastavaa arvioida. Jos oletetaan, että sekä aikaisuus että kasvin morfologiset ominaisuudet vaikuttavat punahomekestävyyteen, ei kokeen perusteella voida sanoa selittävätkö juuri kasvin ympärysmittassa havaitut erot poikkeavuuksia punahomekestävyydessä. Joka tapauksessa lajikevertailussa muita alttiimmaksi havaittu ja ennalta tiedetysti muita alttiimpi Sofiina erottui havainnoissa selkeimmin muista aikaisuudellaan ja kasvunopeudellaan. Sen sijaan muita hitaammin ja muita

suuremmaksi kasvanut VIR 7766 oli lajikevertailussa muita kestävämpi punahomeinfektiota vastaan. Punahomekestävyyden ja morfologisten erojen yhteyksistä ei kokeen perusteella voitu tehdä johtopäätöksiä. Punahomeen pistetartutus kertoo taudinkestävydestä lähinnä vain solukon tasolla, jolloin kestävyiden yhteyttä morfologisiin suureisiin ei voida toteutettujen kokeiden perusteella päätellä. Todellisen kestävyiden löytämiseksi tulisi arvioida kauragenotyyppisiä menetelmillä, jotka samanaikaisesti huomioivat punahomekestävyyden eri ulottuvuuksia (Juho Hautsalo, Luke, kommentti kirjoittajalle 23.11.2018).

RGB-kuvausta käytetään usein aineiston keruuseen värianalyysiä varten, jolloin voidaan seurata esimerkiksi kasvitauti-infektion etenemistä (Furbank ja Tester 2011), mutta menetelmä on tehokas myös morfologisten suureiden määrittelyyn (Humplik ym. 2015). RGB-kuvausta hyödyntävissä kasvitautiresistenssiä tutkivissa kokeissa voidaan vertailla lajike-eroja suoraan kasveissa ilmenevien infektion oireiden perusteella (Diaz-Lago ym. 2003; Green ym. 2012). Lisäksi ainakin biomassan (Humplik ym. 2015) ja abioottisten stressitekijöiden (Golzarian ym. 2011) vaikutusta kasvin morfologisiin ominaisuuksiin voidaan tarkastella RGB-kuvista, mutta morfologisten suureiden yhteyttä kasvitautiresistenssiin ei ole suuressa määrin tutkittu RGB-kuvauksen menetelmin.

8.2 Kasvatusalustojen vertailukoe

Kokeen ensisijainen tarkoitus oli löytää sopivimmat *in vitro* –kasvatusalustat punahomeinfektion etenemisen seurantaan tähkylöissä varsinaista lajikevertailukoetta varten. Kokeen aineiston pohjalta suoritetun analyysin perusteella havaittiin, että tähkylöiden kasvatusalusta vaikuttaa infektion etenemiseen epäjohdonmukaisesti ja vain harvoissa seurannan aikapisteissä. Vaikutukset olivat toisistaan poikkeavia riippuen siitä, tarkasteltiinko taudin ankaruutta vai oireisen solukon kokoa. Myös yksi- ja kaksisuuntainen varianssianalyysi antoivat keskenään erilaisia tuloksia, siten, että merkitsevät erot ilmenivät osin eri aikapisteissä ja eri tähkylöiden keräystavoissa. Yleisesti ottaen kasvatusalusta vaikutti merkitsevämmiin taudin ankaruuteen, kuin oireisen solukon kokoon. Kontrollissa havaittu kasvatusalustan vaikutus selittynee kasvatusalustalle päätyneellä selittämättömällä ylimääräisellä kontaminaatiolla, joka vaikutti tähkylän fluoresenssiin.

Fluoresenssiaineiston perusteella ei voitu osoittaa jonkin kasvatusalustan olevan muista ratkaisevasti poikkeava. Koska fluoresenssiaineiston analyysitulokset eivät olleet johdonmukaisia, pääteltiin, että lajikevertailukokeen kannalta kasvatusalustan valinnalla ei ole suurta merkitystä infektion etenemiseen ja siten mahdollisten genotyyppierojen löytymisen onnistumiseen. Kuitenkin PDA-alustalla sienirihmaston kasvu oli silminnähden selkeästi runsaampaa muihin alustoihin verrattuna, minkä epäiltiin mahdollisesti häiritsevän fluoresenssin havaitsemista etenkin infektion loppuvaiheessa. Tästä syystä PDA-alustaa ei päätetty valita kasvatusalustaksi lajikevertailukokeeseen. Kasvatusalustojen kuivumisen havaittiin kuitenkin vaikuttavan sienirihmaston kasvun runsauteen. Kosteus säilyi petrimaljoilla sitä heikommin, mitä useammin petrimaljojen kansia jouduttiin fluoresenssikuvausta varten avaamaan. MS-alustalla havaittiin muita kasvatusalustoja enemmän taudinaiheuttajan kuromaitiöiden muodostukseen mahdollisesti viittaavia oransseja rakenteita. Koska ainakin *F. oxysporum* tapauksessa mikroravinteiden puutosten on todettu vaikuttavan sienien itiöintiin (Jones ym. 1989), MS-alusta päätettiin valita varsinaisessa lajikevertailukokeessa käytettäväksi kasvatusalustaksi sen A-alustaa runsaamman ravinnetarjonnan vuoksi.

Tulosten perusteella ei voitu todeta selkeitä eroja infektion etenemisessä myöskään tähkylöiden keräystapojen välillä. Tähkylöiden kehitys petrimaljalla tai tähkylän vanheneminen ei näyttänyt poikkeavan keräystapojen välillä. Analyysissä havaittiin kasvatusalustan merkitsevän vaikutuksen ilmenevän yhtä lailla molempien tähkylöiden keräystapojen tilanteessa. Tähkylöiden keräystavalla ei päätelty olevan lajikevertailukokeen kannalta ratkaisevaa merkitystä, joten lajikevertailukokeen käytännön järjestelyjen helpottamiseksi kaikki tähkylät päätettiin lajikevertailukokeessa kerätä kasveista kaksi päivää ennen tartutusta.

8.3 Lajikevertailukoe punahometartutuksilla

Genotyyppien eroja fotosynteesin heikkenemisessä päätettiin tarkastella kolmen vuorokauden kuluttua tartutuksesta, koska silloin infektion etenemisen seurannan perusteella tartunta oli jo tuottanut selkeästi ilmeneviä oireita tähkylöihin ja heikentänyt tähkylän fotosynteesiä lähtötilanteeseen verrattuna. Genotyyppierojen löytymisen kannalta tämän vaiheen ajateltiin olevan olennainen, koska ennen tätä

infektion oireita ilmeni vain vähän ja tämän jälkeen sienirihmaston kasvu runsastui merkittävästi ja tähkylöiden solukko alkoi jo kokonaan kuolla. Verrokkina tälle ajankohdalle, genotyyppieroja päätettiin tarkastella myös tartutuspäivänä välittömästi tartutuksen jälkeen.

Lajikevertailukokeessa havaittiin, että Sofiinassa tähkylöiden fotosynteesi oli heikentynyt merkitsevästi muita genotyyppijä enemmän kolmen vuorokauden kuluttua tartutuksesta. Suurin poikkeavuus taudin ankaruudessa havaittiin Akseliin, VIR 14720:een ja VIR 7766:een verrattuna. Suure $Q_y\text{max}$ laski tarkasteltuna ajankohtana infektoituneessa solukossa Sofiinan tähkylöissä keskimäärin tasolle 0,3, kun muiden genotyyppien tähkylöissä vastaava arvo jäi keskimäärin yli 0,45:n. Myös oireisen solukon koko oli Sofiinan tähkylöissä muita genotyyppijä suurempi kolmen vuorokauden kuluttua tartunnasta, mutta ero oli tilastollisesti merkitsevä vain VIR 7766:een verrattuna. Tulosten perusteella pääteltiin Sofiinan olevan muita alttiimpi punahometartunnalle, infektion ollessa kehittynyt tarkasteltuna ajankohtana siinä muita pidemmälle. Taudin ankaruus ilmaisee genotyyppierot infektion etenemisnopeudessa selkeämmin, kuin oireisen solukon koko. VIR 7766 vastusti Akselin ja VIR 14720:n ohella infektion etenemistä parhaiten. VIR 7766:n kestävyys punahometartuntaa vastaan saattaa liittyä genotyyppin ruskeajyväisyyteen. Kauran ruskeajyväisyyden tai ruskeiden kaleiden on havaittu liittyvän punahomekestävyyteen (Rainio 1932; Loskutov ym. 2017).

Myös tartutuspäivänä fluoresenssissa ilmeni poikkeavuuksia genotyyppien välillä. Näiden tulosten perusteella Akseli vaikutti kestävämmältä verrattuna etenkin Belindaan ja VIR 14720:een. Nämä poikkeavuudet havaittiin kuitenkin vain taudin ankaruuden tilanteessa. Nämä tulokset saattaisivat viitata esimerkiksi tähkylän irrottamisesta aiheutuneesta stressistä, tähkylöiden keruun aikana kasvihuoneessa vallinneesta kuumuudesta tai muista stressitekijöistä aiheutuvaan fotosynteesin heikkenemiseen tartunnan oireiden sijasta tai niiden lisäksi. Ainakin Mendanha ym. (2018) ovat havainneet kuumuusstressin heikentävän fotosysteemi II:n suurinta fotokemiallista tehokkuutta vehnän lehdissä. Tähkylöitä kerätessä niiden nuorimpien kukkien havaittiin abortoituneen useissa tähkylöissä keräysaikana kasvihuoneessa vallinneiden

kuumien olosuhteiden takia, mikä saattoi vaikuttaa tähkylän fluoresenssissa ilmeneviin genotyyppien välisiin eroihin varsinkin infektion seurannan alkuvaiheissa.

Erot terveen ja infektoituneen solukon välillä kyettiin fluoresenssiaineistosta tähkylätasolla havaitsemaan kolmen vuorokauden kuluttua tartutuksesta, kun Bauriegel ym. (2010) havaitsivat saman tähkätasolla *F. culmorumilla* sumutustartutetuissa vehnissä vasta 5-6 vuorokauden kuluttua tartutuksesta. Scholes ja Rolfe (1996) puolestaan havaitsivat, että rengasruosteen seurauksena viiden vuorokauden kuluttua tartutuksesta fotosynteesi kauran lehtien infektoituneilla alueilla oli hieman heikentynyt ja alueilla, joissa tartuntaa ei ollut, se oli säilynyt terveen solukon tasolla. Kahdeksan vuorokauden kuluttua se oli laskenut jo kauttaaltaan koko lehden alueella ja 11 vuorokauden kuluttua fotosynteesi oli voimakkaasti heikentynyt koko lehden alueella.

Taudin ankaruus ja oireisen solukon koko osoittivat fluoresenssiaineistossa keskenään samansuuntaisia vaikkakin merkitsevyydeltään erilaisia tuloksia. Taudin ankaruuden perusteella johtopäätökset olivat selkeämpiä ja merkitseviä eroja löytyi enemmän, kuin oireisen solukon koon perusteella. Jälkimmäisen suureen tilanteessa epävarmuutta tuloksiin toi se, että yksittäisen tähkylän koko ei pysynyt koko seurantajakson aikana täysin samana. Kuva-aineiston perusteella havaittiin, että tähkylät liikkuvat kasvatusalustoilla hieman niiden avautuessa ja sulkeutuessa kukinnan normaalin vuorokausirytmien mukaan. Lisäksi tähkylän väliaikainen irrottaminen kasvatusalustasta tartutusta varten saattoi vaikuttaa infektion seurannan alkuvaiheessa tähkylän asennon kautta myös fluoresenssikameran havaitsemaan tähkylän kokonaispinta-alaan. Luonnollisesti myös kullekin genotyyppille ominainen tähkylän koko vaikutti oireisen solukon kokoon siten, että suurikokoisissa tähkylöissä, kuten genotyyppin VIR 14720 tapauksessa tartunta saattoi levitä laajemmalle alueelle pienikokoisiin tähkylöihin verrattuna. Tämä vaikutus kyettiin kuitenkin poistamaan suhteuttamalla oireisen solukon koko tähkylän kokonaisalaan.

Kokeessa onnistuttiin fluoresenssikameralla seuraamaan infektion etenemistä tähkylöissä. Verrattaessa fluoresenssikuvia järjestelmäkameralla otettuihin kuviin, tunnistettavat infektion vaiheet oli mahdollista erottaa molemmista. Silminnähden havaittava ruskeiden laikkujen ilmaantuminen tähkylän pintaan nähtiin solukon fotosysteemi II:n suurimman fotokemiallisen tehokkuuden alenemisena vastaavassa

kohdassa terveen solukon tasolta arvoon 0,3 – 0,5. Taudin kattaessa suurimman osan tähkylästä seurannan loppuvaiheilla, kuvapikseleiden arvo oli laskenut tasolle 0,0 – 0,2. Myös Bauriegel ym. (2010) havaitsivat voimakkaassa vehnän tähkän punahomeinfektiossa vastaavia arvoja sisältävien kuvapikseleiden osuuden olevan suuri. Sienirihmaston kasvu puolestaan voitiin havaita tähkylän muuttuessa fluoresenssikuvassa ensin epätarkaksi ja tämän jälkeen sen hävitessä kokonaan fotosysteemi II:n suurimman fotokemiallisen tehokkuuden laskiessa nolnaan. Infektion oireet havaittiin fluoresenssi- ja järjestelmäkameran kuvissa samanaikaisesti, vaikka muun muassa Daleyn (1994) mukaan fluoresenssikuvauksen avulla sieni-infektion oireet olisi mahdollista havaita jo ennen silminnähtävien oireiden ilmaantumista. Bürling ym. (2011) mukaan fluoresenssikuvauksen avulla härmän oireet kyettiin erottamaan vehnän lehdellä typpitaseeseen liittyvistä fysiologisista oireista jo vuorokauden ja lehtiruosteen oireet kahden vuorokauden kuluttua tartutuksesta. Silmämääräiset havainnot taudin etenemisestä olivat osin samanlaisia, kuin Tekle ym. (2012) tekemät havainnot. Heidän mukaansa ensimmäiset näkyvät infektion oireet ilmaantuivat samalla tavoin noin kolmen vuorokauden kuluttua tartunnasta, mutta he havaitsivat sienirihmaston kasvua jo vuorokauden kuluttua tartutuksesta.

9 JOHTOPÄÄTÖKSET

Suoritetuissa kokeissa kyettiin hyödyntämään RGB- ja fluoresenssikuvauksen menetelmiä kauran punahomeinfektion etenemisen seurannassa, taudin etenemisnopeuteen liittyvien genotyyppierojen selvittämisessä ja kauran kasvun ja morfologian seurannassa. Kehitettyjä punahomeen pistetartutus-, kauran tähkylöiden fenotyyppaus- sekä fluoresenssiaineiston analysointimenetelmiä oli onnistuneesti mahdollista testata varsinaisessa lajikevertailukokeessa. Näiden menetelmien ja koemallien avulla lajikevertailukokeessa oli mahdollista seurata punahomeinfektion etenemisen vaiheita ja osoittaa alttiiksi ja kestävämmäksi todettujen genotyyppien välillä olevan eroja infektion etenemisnopeudessa. Sofiinan ennalta tunnettu alttius punahomeinfektioon kyettiin kokeen menetelmin vahvistamaan. Lisäksi ainakin Akseli ja VIR 7766 kyettiin tunnistamaan punahometta muita paremmin kestäviksi genotyypeiksi.

Kasvatusalustojen vertailukoetta kyettiin käyttämään apuna lajikevertailukokeeseen sopivien tähkylöiden *in vitro* –kasvatusalustojen valinnassa. Kauran kasvun ja

morfologian seurantakokeessa pystyttiin luomaan aikasarjaa kasviyksilöiden morfologisten ominaisuuksien kehittymisestä ja vertailemaan näiden ominaisuuksien suhteen ilmeneviä genotyyppieroja. Morfologisten ominaisuuksien yhteyttä genotyyppien punahomeresistenssiin ei kokeen perusteella voitu luotettavasti selvittää, mutta ominaisuuksien kehittymisen yhteys genotyyppien aikaisuuteen voitiin havaita. Koe pohjusti luontevasti varsinaista lajikevertailukoetta avaten punahomeresistenssiin vaikuttavien tekijöiden moniulotteisuutta. Yleisesti kokeiden perusteella voidaan todeta, että RGB- ja fluoresenssikuvaukseen perustuvia fenotyyppausmenetelmiä voidaan tulevaisuudessa mahdollisesti hyödyntää kasvinjalostuksessa jalostusmateriaalin fenotyyppaukseen jalostusvalintaa varten ja siten edistää kasvitaudeille resistenttien lajikkeiden kehitystä. Kokonaisvaltaisen taudinkestävyyden arvioimiseksi koemenetelmät vaativat kuitenkin jatkotutkimusta ja kehittämistä.

10 KIITOKSET

Haluan kiittää tutkija Juho Hautsaloa projektin ohjauksesta, kokeiden suunnittelusta, punahomeisiin liittyvästä asiantuntemuksesta sekä kirjallisen työn kommentoinnista. Haluan kiittää myös tutkimuskoordinaattori Kristiina Himasta fenotyyppaukseen liittyvästä asiantuntemuksesta ja kirjallisen työn kommentoinnista sekä tutkija Mirko Pavicicia avusta kokeiden käytännön toteutuksessa, kuvantamislaitteistojen käytössä sekä aineiston analysoinnissa.

11 LÄHTEET

- Bauriegel E., Giebel A. & Herppich W. B. 2010. Rapid *Fusarium* head blight detection on winter wheat ears using chlorophyll fluorescence imaging. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 83: 196-203.
- Berger B., Regt B. & Tester M. 2012. High-throughput phenotyping of plant shoots. Teoksessa: Normanly J. (toim.) *High-Throughput Phenotyping in Plants. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* 918. Totowa, New Jersey, USA: Humana Press. s. 9-20.
- Berlin A., Samils B., Djurle A., Wirsén H., Szabo L. & Yuen J. 2013. Disease development and genotypic diversity of *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* in Swedish oat fields. *Plant Pathology* 62: 32–40.

- Bernhoft A., Torp M., Clasen P.-E., Løes A.-K. & Kristoffersen A. B. 2010. Factors influencing *Fusarium* and mycotoxin concentrations in Norwegian cereals. Bioforsk FOKUS 5 (7): 18. NBFS 2010: Nordic Baltic Fusarium Seminar, Ski, Norja, 23-25.11.2010.
- Bjørnstad Å., He X., Tekle S., Klos K., Huang Y-F., Tinker N. A., Dong Y. & Skinnes H. 2017. Genetic variation and associations involving *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in cultivated oat (*Avena sativa* L.). Plant Breeding 136 (5): 620-636.
- Bjørnstad Å. & Skinnes H. 2008. Resistance to *Fusarium* infection in oats (*Avena sativa* L.). Cereal Research Communications 36 (6): 57-62.
- Bonnett O. T. 1966. Inflorescences of Maize, Wheat, Rye, Barley, and Oats: Their initiation and development. University of Illinois College of Agriculture, Agricultural Experiment Station Bulletin 721.
- Bravo C., Moshou D., West J., McCartney A. & Ramon H. 2003. Early disease detection in wheat fields using spectral reflectance. Biosystems Engineering 84 (2): 137-145.
- Burrows V. D. 2011. Hulless oat development, applications and opportunities. Teoksessa: Webster F. H. & Wood P. J. Oats: chemistry and technology. 2. painos. St. Paul, Minnesota, USA: AACC International Inc. s. 31-50.
- Bürling K., Hunsche M. & Noga G. 2011. Use of blue-green and chlorophyll fluorescence measurements for differentiation between nitrogen deficiency and pathogen infection in winter wheat. Journal of Plant Physiology 168: 1641-1648.
- Callaghan A. R. 1931. A study of anthesis in cultivated oats. Teoksessa: Agricultural Gazette of N.S.W. Vol. 42. New South Wales, Australia: Department of Agriculture. s. 311-321.
- Daley P. F. 1995. Chlorophyll fluorescence analysis and imaging in plant stress and disease. Canadian Journal of Plant Pathology 17 (2): 167-173.
- Delcour J. A. & Hosene R. C. 2010. Principles of cereal science and technology. 3. painos. St. Paul, Minnesota, USA: AACC International Inc. 270 s.

- Díaz-Lago J. E., Stuthman D. D. & Leonard K. J. 2003. Evaluation of components of partial resistance to oat crown rust using digital image analysis. *Plant Disease* 87 (6): 667-674.
- Dumont J., Hirvonen T., Heikkinen V., Mistretta M., Granlund L., Himanen K., Fauch L., Porali I., Hiltunen J., Keski-Saari S., Nygren M., Oksanen E., Hauta-Kasari A. & Keinänen M. 2015. Thermal and hyperspectral imaging for Norway spruce (*Picea abies*) seeds screening. *Computers and Electronics in Agriculture* 116: 118-124.
- EFSA. 2011. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to beta-glucans from oats and barley and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 1236, 1299), increase in satiety leading to a reduction in energy intake (ID 851, 852), reduction of post-prandial glycaemic responses (ID 821, 824), and “digestive function” (ID 850) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2207>. Parma, Italia: European Food Safety Authority. Julkaistu 30.6.2011. Tulostettu 18.7.2018.
- Elen O., Hofgaard I. S., Brodal G., Aamot H. U. & Klemsdal S. S. 2010. Prediction models for deoxynivalenol content of Norwegian wheat and oats. *Bioforsk FOKUS* 5 (7): 22. NBFS 2010: Nordic Baltic Fusarium Seminar, Ski, Norja, 23-25.11.2010.
- Euroopan komissio. 2006. Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels of certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L364, 5-24.
- Evira. 2018. Suomen Kasvilajiketiedote 2018:1. <https://www.ruokavirasto.fi/tietoa-meista/julkaisut/suomen-kasvilajiketiedotteet/>. Helsinki, Suomi: Elintarviketurvallisuusvirasto (nyk. Ruokavirasto). Julkaistu 2018. Tulostettu 5.7.2018.
- FAOSTAT. 2017. Crops and livestock products. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/TP>. Rooma, Italia: Database of Food and Agriculture, Organization of the United Nations. Julkaistu 2017. Viitattu 18.7.2018.

- Fulcher R. G. 1986. Morphological and chemical organization of the oat kernel. Teoksessa: Webster F. H. (toim.) Oats: chemistry and technology. 1. painos. St. Paul, Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists Inc. s. 47.
- Furbank R. T. & Tester M. 2011. Phenomics – technologies to relieve the phenotyping bottleneck. Trends in Plant Science 16 (12): 635-644.
- Chaerle L., Hagenbeek D., Bruyne E., Valcke R. & Van Der Straeten D. 2004. Thermal and chlorophyll-fluorescence imaging distinguish plant-pathogen interactions at an early stage. Plant Cell Physiology 45 (7): 887-896.
- Chaerle L. & Van Der Straeten D. 2000. Imaging techniques and the early detection of plant stress. Trends in Plant Science 5 (11): 495-501.
- Gagkaeva T., Gavrilova O. P., Yli-Mattila T. & Loskutov I. G. 2013. Sources of resistance to *Fusarium* head blight in VIR oat collection. Euphytica 191 (3): 355-364.
- Golzarian M.R., Frick R. A., Rajendran K., Berger B., Roy S., Tester M. & Lun D. S. 2011. Accurate inference of shoot biomass from high-throughput images of cereal plants. Plant Methods 7: 2.
- Goswami R. S. & Kistler H. C. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. Molecular Plant Pathology 5 (6): 515-525.
- Green J. M., Appel H., Rehrig E. M., Harnsomburana J., Chang J-F., Balint-Kurti P. & Shyu C-R. 2012. PhenoPhyte: a flexible affordable method to quantify 2D phenotypes from imagery. Plant Methods 8: 45.
- He X., Skinnes H., Oliver R. E., Jackson E. W. & Bjørnstad Å. 2013. Linkage mapping and identification of QTL affecting deoxynivalenol (DON) content (*Fusarium* resistance) in oats (*Avena sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics 126 (10): 2655-2670.
- Hietaniemi V., Rämö S., Yli-Mattila T., Jestoi M., Peltonen S., Kartio M., Sieviläinen E., Koivisto T. & Parikka P. 2016. Updated survey of *Fusarium* species and toxins in Finnish cereal grains. Food Additives & Contaminants: Part A, 33 (5): 831-848.

- Humplík J. F., Lazár D., Husíčková A. & Spíchal L. 2015. Automated phenotyping of plant shoots using imaging methods for analysis of plant stress responses – a review. *Plant Methods* 11: 29.
- Jalli M. & Parikka P. 2012. Kevätviljojen kasvitaudit. Teoksessa: Ahvenniemi P. (toim.) Ajankohtaisia kasvinsuojeluohjeita. 2012. 15. painos. Helsinki, Suomi: Kasvinsuojeluseura ry. s. 39-56.
- Jones J. P., Engelhard A. W. & Woltz S. S. 1989. Management of Fusarium wilt of vegetables and ornamentals by macro- and microelement nutrition. Teoksessa: Engelhard A. W. (toim.) Soilborne plant pathogens: Management of diseases with macro- and microelements. 1990. 2. painos. St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological society. 217 s.
- Keinänen M. 2017a. Luentodiat: Imaging systems and traits to measure in plants. Plant phenotyping technologies, University of Helsinki, 28.8.2017. Joensuu, Suomi: Itä-Suomen yliopisto. 66 s.
- Keinänen M. 2017b. Luentodiat: Hyperspectral and thermal imaging Nappi 2017. Joensuu, Suomi: Itä-Suomen yliopisto. 69 s.
- Kokkonen M. K., Ojala L. M., Parikka P. & Jestoi M. N. 2010. Mycotoxin production of *Fusarium* spp. isolated from Finnish grains. *Bioforsk FOKUS* 5 (7): 24. NBFS 2010: Nordic Baltic Fusarium Seminar, Ski, Norja, 23-25.11.2010.
- Langevin F., Eudes F. & Comeau A. 2004. Effect of trichothecenes produced by *Fusarium graminearum* during *Fusarium* head blight development in six cereal species. *European Journal of Plant Pathology* 110: 735–746.
- Lillemo M., Skinnes H., Bjørnstad Å., Buraas T., Reitan L., Bergersen S. & Dieseth J. A. 2014. Choice of resistant cultivars as a means to reduce the risk of mycotoxins in wheat, barley and oats – how big are varietal differences, and what are the characteristics of resistant cultivars? *NJF Report* 10 (9): s. 10. Nordic Baltic Fusarium seminar (NBFS), Helsinki, Suomi, 18-19.11.2014.
- Luke. 2018a. Tilastotietokanta. Peltoalan käyttö 1910 ja 1920-. http://statdb.luke.fi/PXWeb/pxweb/fi/LUKE/LUKE_02%20Maatalous_04%20Tuot

- [anto_22%20Kaytossa%20oleva%20maatalousmaa/03_Peltoala_1910_ja_1920-.px/?rxid=22aa547f-317d-466c-80c6-de19efca46de](http://statdb.luke.fi/PXWeb/pxweb/fi/LUKE/LUKE_02%20Maatalous_04%20Tuotanto_22%20Kaytossa%20oleva%20maatalousmaa/03_Peltoala_1910_ja_1920-.px/?rxid=22aa547f-317d-466c-80c6-de19efca46de). Helsinki, Suomi: Luonnonvarakeskus. Julkaistu 17.7.2018. Viitattu 19.7.2018.
- Luke. 2018b. Tilastotietokanta. Käytössä oleva maatalousmaa ELY-keskuksittain. http://statdb.luke.fi/PXWeb/pxweb/fi/LUKE/LUKE_02%20Maatalous_04%20Tuotanto_22%20Kaytossa%20oleva%20maatalousmaa/01_Kaytossa_oleva_maatalousmaa_ELY.px/?rxid=4e92bf68-d281-4978-b35a-5a3c07d7051a. Helsinki, Suomi: Luonnonvarakeskus. Julkaistu 17.7.2018. Viitattu 19.7.2018.
- Luke. 2018c. Tilastotietokanta. Sato 1920- (milj. kg). http://statdb.luke.fi/PXWeb/pxweb/fi/LUKE/LUKE_02%20Maatalous_04%20Tuotanto_14%20Satotilasto/03_Vilja- ja_perunasato_1920-.px/?rxid=4e92bf68-d281-4978-b35a-5a3c07d7051a. Helsinki, Suomi: Luonnonvarakeskus. Julkaistu 17.7.2018. Viitattu 18.7.2018.
- Luke. 2018d. Tilastotietokanta. Ravintotase (milj. kg). http://statdb.luke.fi/PXWeb/pxweb/fi/LUKE/LUKE_02%20Maatalous_08%20Muut_02%20Ravintotase/02_Ravintotase.px/?rxid=6887709d-4f81-4e6a-b529-88b252616a6b. Helsinki, Suomi: Luonnonvarakeskus. Julkaistu 29.6.2018. Viitattu 18.7.2018.
- Luke. 2018e. Tilastotietokanta. Elintarvikkeiden kulutus henkeä kohti (kg/vuosi). http://statdb.luke.fi/PXWeb/pxweb/fi/LUKE/LUKE_02%20Maatalous_08%20Muut_02%20Ravintotase/01_Elintarvikkeiden_kulutus.px/?rxid=6887709d-4f81-4e6a-b529-88b252616a6b. Helsinki, Suomi: Luonnonvarakeskus. Julkaistu 29.6.2018. Viitattu 18.7.2018.
- Loskutov I. G., Blinova E. V., Gavrilova O. P. & Gagkaeva T. Y. 2017. The valuable characteristics and resistance to *Fusarium* disease of oat genotypes. Russian Journal of Genetics: Applied Research 7 (3): 290-298.
- Mahlein A-K. 2016. Plant disease detection by imaging sensors – parallels and specific demands for precision agriculture and plant phenotyping. Plant Disease 100 (2): 241-251.

- Mavi. 2017. Viljat ja öljykasvit lajikkeittain 2017. <https://www.vyr.fi/fin/ajankohtaista/uutiset/2017/07/viljelyalat-lajikkeittain-2017>. Seinäjoki, Suomi: Maaseutuvirasto (nyk. Ruokavirasto). Julkaistu 2017. Tulostettu 21.3.2018.
- Mendanha T., Rosenqvist E., Hyldgaard B. & Ottosen C-O. 2018. Heat priming effects on anthesis heat stress in wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) with contrasting tolerance to heat stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 132: 213-221.
- Mesterházy A. 1995. Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breeding* 114: 377-386.
- Miller J. D., Young J. C. & Sampson D. R. 1985. Deoxynivalenol and *Fusarium* head blight resistance in spring cereals. *Journal of Phytopathology* 113: 359-367.
- Misonoo G. 1936. Ecological and physiological studies on the blooming of oat flowers. *Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido Imperial University* 37 (4): 211-337.
- MLL. 2016. Viljelyaloja lajikkeittain 2016. <https://www.vyr.fi/fin/viljelytietoa/tilastoja/viljelyalat-lajikkeittain/>. Helsinki, Suomi: Maanmittauslaitos. Julkaistu 2016. Tulostettu 21.3.2018.
- Mossberg B. & Stenberg L. 2003. Suuri Pohjolan kasvio. 3. painos. Helsinki, Suomi: Kustannus Oy Tammi. 928 s.
- Murchie E. H. & Lawson T. 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany* 64 (13): 3983-3998.
- Nishiyama I. 1970. Four types of flowering time in *Avena*. *The Japanese Journal of Genetics* 45 (5): 399-409.
- Oerke O-C., Steiner U., Dehne H-W. & Lindenthal M. 2006. Thermal imaging of cucumber leaves affected by downy mildew and environmental conditions. *Journal of experimental Botany* 57 (9): 2121-2132.

- Parikka P., Hakala K. & Tiilikkala K. 2012. Expected shifts in *Fusarium* species` composition on cereal grain in Northern Europe due to climatic change. Food Additives & Contaminants: Part A, 29 (10): 1543-1555.
- Parikka P., Kangas A., Högnäsbacka M., Hietaniemi V. & Rämö S. 2010. *Fusarium* infection on barley and oats in Finland. Bioforsk FOKUS 5 (7): 31. NBFS 2010: Nordic Baltic Fusarium Seminar, Ski, Norja, 23-25.11.2010.
- Parry D. W., Jenkinson P. & McLeod L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals – a review. Plant Pathology 44: 207-238.
- Peltonen-Sainio P., Rajala A. & Seppälä R. T. 2005. Viljojen kehityksen ja kasvun ABC. Jokioinen, Suomi: Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus MTT, Maa- ja elintarviketalous 67. Kasvintuotanto. 72 s. <http://jukuri.luke.fi/handle/10024/459167>. Julkaistu 2005. Tulostettu 2.3.2018.
- PSI. 2016. Technical documentation and user`s manual. Operation maintenance and safety instructions. Plant Screen™ Conveyor System, Compact System, Helsingin yliopisto. Drasov, Tsekin tasavalta: Photon Systems Instruments, spol. s. r. o.
- Rainio A. J. 1932. Punahome *Fusarium roseum* link-*Gibberella saubinetii* (Mont.) Sacc. ja sen aiheuttamat myrkytykset kaurassa. Valtion maatalouskoetoiminnan julkaisuja 50. Helsinki, Suomi: Valtioneuvoston kirjapaino. 45 s.
- Rousseau C., Belin E., Bove E., Rousseau D., Fabre F., Berruyer R., Guillaumès J., Manceau C., Jacques M-A. & Boureau T. 2013. High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. Plant Methods 9: 17.
- Sarvikas P., Suorsa M., Rintamäki E., Vapaavuori E., Aro E-M. & Tyystjärvi E. 2017. Fotosynteesi. 1. painos. Helsinki, Suomi: Books on Demand GmbH. 301 s.
- Scholes J. D. & Rolfe A. 1996. Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. Planta 199: 573-582.

- Scholes J. D. & Rolfe A. 2009. Chlorophyll fluorescence imaging as tool for understanding the impact of fungal diseases on plant performance: a phenomics perspective. *Functional Plant Biology* 36: 880-892.
- Schroeder H. W. & Christensen J. J. 1963. Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 53: 831-838.
- Singh C. B., Jayas D. S., Paliwal J. & White N. D. G. 2007. Fungal detection in wheat using near-infrared hyperspectral imaging. *Transactions of the ASABE* 50 (6): 2171-2176.
- Sutton J. C. 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 4: 195-209.
- Tallada J. G., Wicklow D. T., Pearson T. C. & Armstrong P. R. 2011. Detection of fungus-infected corn kernels using near-infrared reflectance spectroscopy and color imaging. *Transactions of the ASABE* 54 (3): 1151-1158.
- Tapio E., Bremer K. & Valkonen J. P.T. 1997. Viruses and their significance in agricultural and horticultural crops in Finland. *Agricultural and Food Science in Finland* 6: 323-336.
- Teena M., Manickavasagan A., Al-Sadi A. M., Al-Yahyai R., Deadman M. L. & Al-Ismaïli A. 2016. RGB color imaging to detect *Aspergillus flavus* infection in dates. *Journal of Food and Agriculture* 28(10): 683-688.
- Tekle S., Bjørnstad Å., Skinnes H., Dong Y. & Segtnan V. H. 2013b. Estimating deoxynivalenol content of ground oats using VIS-NIR spectroscopy. *Cereal Chemistry* 90 (3): 181-185.
- Tekle S., Dill-Macky R., Skinnes H., Tronsmo A. M. & Bjørnstad Å. 2012. Infection process of *Fusarium graminearum* in oats (*Avena sativa* L.). *European Journal of Plant Pathology* 132 (3): 431-442.
- Tekle S., Lillemo M., Skinnes H., Reitan L., Buraas T. & Bjørnstad Å. 2018. Screening of oat accessions for *Fusarium* head blight resistance using spawn-inoculated field experiments. *Crop Science* 58 (1): 143-151.

- Tekle S., Måge I., Segtnan V. H. & Bjørnstad Å. 2015. Near-infrared hyperspectral imaging of *Fusarium*-damaged oats (*Avena sativa* L.). *Cereal Chemistry* 92 (1): 73-80.
- Tekle S., Skinnes H. & Bjørnstad Å. 2013a. The germination problem of oat seed lots affected by *Fusarium* head blight. *European Journal of Plant Pathology* 135: 147-158.
- Thrane U. 2010. Occurrence of *Fusarium* and mycotoxins within the Nordic and Baltic countries. Bioforsk FOKUS 5 (7): 6. NBFS 2010: Nordic Baltic Fusarium Seminar (NBFS), Ski, Norway 23-25 November 2010.
- Tieteen termipankki. 2014a. <https://tieteentermipankki.fi/wiki/Kasvitiede:t%C3%A4hky%C3%A4>. Päivitetty 20.12.2014. Viitattu 19.7.2018.
- Tieteen termipankki. 2014b. <https://tieteentermipankki.fi/wiki/Kasvitiede:aleuronikerros>. Päivitetty 20.12.2014. Viitattu 29.8.2018.
- VIR. 2018. VIR Plant genetic resources database. http://91.151.189.38/virdb/maindb?enable_advanced_search=false&searchField1=accenumb&searchStr1=&searchStrOr1=&searchStrOr11=&searchField2=nameRus&searchStr2=&searchStrOr2=&searchStrOr22=&searchField3=genus&searchStr3=&searchStrOr3=&searchStrOr33=&searchField4=spesies&searchStr4=&searchStrOr4=&searchStrOr44=&searchField5=country&searchStr5=&searchStrOr5=&searchStrOr55=&genusChoice=1&SearchString=&txtMaxRec=200. Pietari, Venäjä: N.I.Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR). Viitattu 30.8.2018.
- VYR. 2016. Vilja-alan yhteistyöryhmä. DON-toksiinipitoisuus eri kauralajikkeissa kaupan ja teollisuuden vastaanottonäytteissä vuosina 2014-2016. <https://www.vyr.fi/fin/ajankohtaista/uutiset/2017/10/punahomeen-don-toksiinin-esiintymista-eri-kauralajikkeissa-eri-vuosina-kartoitettu/>. Julkaistu 2016. Tulostettu 19.7.2018.
- VYR ja PTT. 2016. Kansallisen viljastrategian väliraportti – katsaus sektorin tilanteeseen ja toimenpidesuosituksat. <https://www.vyr.fi/fin/raportit/kansallinen->

[viljastrategia/](#). Helsinki, Suomi: Vilja-alan yhteistyöryhmä. Helsinki, Suomi: Pellervon taloustutkimus. Julkaistu 2016. Tulostettu 21.3.2018.

LIITE 1: TULOKSET SIVULTA KUVATUN YMPÄRYSMITAN VARIANSSIANALYYSEISTÄ KAURAN KASVUN JA MORFOLOGIAN SEURANTAKOKEESSA

Taulukko 1. Varianssianalyysi seitsemän kauragenotyypin ja viiden kerranteen vaikutuksesta sivulta kuvattuun kasvin ympärysmittaan (mm) kaksi viikkoa ennen summittaista röyhyn esiintuloa 28.12.2017 kauran kasvun ja morfologian seurantakokeen ensimmäisessä toistossa.

Neliöiden summa		Vapausasteet	Keskineliö	F-arvo
Vaihtelun lähde				
Genotyyppi	113721373,6	6	18953562,3	8,31**
Kerranne	8684677,4	4	2171169,3	0,95 ^{em}
Genotyyppi *				
kerranne	74819451,3	24	3117477,1	1,37 ^{em}

**: $P < 0,01$; em: ei merkitsevä

Taulukko 2. Parittainen vertailu (Tukey HSD) seitsemän kauragenotyypin välisistä eroista kasvin sivulta kuvatussa ympärysmittassa (mm) kaksi viikkoa ennen summittaista röyhyn esiintuloa 28.12.2017 kauran kasvun ja morfologian seurantakokeen ensimmäisessä toistossa.

Genotyyppi	Ympärysmitan keskiarvoero (mm) y-x					
	Belinda	Odal	Sofiina	Steinar	VIR 14720	VIR 7766
Akseli	157,8	-721,4	-3220,1**	-1078,3	-1112,3	-494,1
Belinda		-879,2	-3377,9**	-1236,1	-1270,1	-651,9
Odal			-2498,7**	-356,9	-390,8	227,3
Sofiina				2141,8**	2107,9**	2726**
Steinar					-33,9	584,2
VIR 14720						618,2

*, **: $P < 0,05$, $P < 0,01$

Taulukko 3. Varianssianalyysi seitsemän kauragenotyypin ja viiden kerranteen vaikutuksesta sivulta kuvattuun kasvin ympärysmittaan (mm) kaksi viikkoa ennen summittaista röyhyn esiintuloa 23.1.2018 kauran kasvun ja morfologian seurantakokeen toisessa toistossa.

Neliöiden summa		Vapausasteet	Keskineliö	F-arvo
Vaihtelun lähde				

Genotyyppi	442492950,8	6	73748825,1	26,3**
Kerranne	14103706,1	4	3525926,5	1,26 ^{em}
Genotyyppi *				
kerranne	172453218,7	23	7497966	2,67**

** : P < 0,01; em: ei merkitsevä

Taulukko 4. Parittainen vertailu (Tukey HSD) seitsemän kauragenotyypin välisistä eroista kasvin sivulta kuvatussa ympärysmittassa (mm) kaksi viikkoa ennen summittaista röyhyn esiintuloa 23.1.2018 kauran kasvun ja morfologian seurantakokeen toisessa toistossa.

Genotyyppi	Ympärysmitan keskiarvoero (mm) y-x					
	Belinda	Odal	Sofiina	Steinar	VIR 14720	VIR 7766
Akseli	4961,7**	37,6	-802,6	3273**	1120,9	-795,2
Belinda		-4924,1**	-5764,3**	-1688,8	-3840,8**	-5756,9**
Odal			-840,1	3235,4**	1083,4	-832,8
Sofiina				4075,5**	1923,5*	7,3
Steinar					-2152*	-4068,2**
VIR 14720						-1916,2*

*, **: P < 0,05, P < 0,01

Taulukko 5. Varianssianalyysi seitsemän kauragenotyypin ja viiden kerranteen vaikutuksesta sivulta kuvattuun kasvin ympärysmittaan (mm) summittaisen röyhyn esiintulon aikaan 11.1.2018 kauran kasvun ja morfologian seurantakokeen ensimmäisessä toistossa.

Neliöiden summa				
Vaihtelun lähde		Vapausasteet	Keskineliö	F-arvo
Genotyyppi	283276513,1	6	47212752,2	10,23**
Kerranne	34236644,4	4	8559161,1	1,86 ^{em}
Genotyyppi *				
kerranne	168825365,6	24	7034390,2	1,53 ^{em}

** : P < 0,01; em: ei merkitsevä

Taulukko 6. Parittainen vertailu (Tukey HSD) seitsemän kauragenotyypin välisistä eroista kasvin sivulta kuvatussa ympärysmittassa (mm) summittaisen röyhyn esiintulon aikaan 11.1.2018 kauran kasvun ja morfologian seurantakokeen ensimmäisessä toistossa.

Genotyyppi	Ympärysmitan keskiarvoero (mm) y-x
------------	------------------------------------

	Belinda	Odal	Sofiina	Steinar	VIR 14720	VIR 7766
Akseli	253,8	79,4	-3230**	-792,3	-1549,7	-4276,2**
Belinda		-174,4	-3483,7**	-1046,1	-1803,5	-4530**
Odal			-3309,3**	-871,7	-1629,1	-4355,6**
Sofiina				2437,6*	1680,3	-1046,3
Steinar					-757,4	-3483,9**
VIR 14720						-2726,6*

*, **: P < 0,05, P < 0,01

Taulukko 7. Varianssianalyysi seitsemän kauragenotyypin ja viiden kerranteen vaikutuksesta sivulta kuvattuun kasvin ympärysmittaan (mm) summittaisen röyhyn esiintulon aikaan 6.2.2018 kauran kasvun ja morfologian seurantakokeen toisessa toistossa.

	Neliöiden summa			
Vaihtelun lähde		Vapausasteet	Keskineliö	F-arvo
Genotyyppi	745176128,1	6	124196021,3	42,44**
Kerranne	59929382,5	4	14982345,6	5,12**
Genotyyppi *				
kerranne	93405863,4	23	4061124,5	1,39 ^{em}

**: P < 0,01; em: ei merkitsevä

Taulukko 8. Parittainen vertailu (Tukey HSD) seitsemän kauragenotyypin välisistä eroista kasvin sivulta kuvatussa ympärysmittassa (mm) summittaisen röyhyn esiintulon aikaan 6.2.2018 kauran kasvun ja morfologian seurantakokeen toisessa toistossa.

Genotyyppi	Ympärysmittan keskiarvoero (mm) y-x					
	Belinda	Odal	Sofiina	Steinar	VIR 14720	VIR 7766
Akseli	5742,9**	-1930,7*	-570,3	3397,6**	174,6	-2384,7**
Belinda		-7673,7**	-6313,2**	-2345,4**	-5568,3**	-8127,7**
Odal			1360,4	5328,3**	2105,3*	-454
Sofiina				3967,9**	744,9	-1814,4
Steinar					-3223**	-5782,3**
VIR 14720						-2559,3**

*, **: P < 0,05, P < 0,01